

ヒト T 細胞白血病ウイルス Tax による 転写制御機構の解析

2003

改田 厚

**ヒト T 細胞白血病ウイルス Tax による
転写制御機構の解析**

2003

改田 厚

目次

緒言	1
第1章 HTLV-1 Tax による p53 ファミリータンパク質の転写活性化能の抑制	3
実験方法	4
実験結果	7
考察	13
第2章 転写コアクチベーター p300 に結合する新規細胞性因子の探索	15
実験方法	16
実験結果	
第1節 p300 (CH1~KIX)領域特異的に結合する因子の同定	21
第2節 p300 と PRS1 の結合検討	24
考察	27
総括および結論	29
謝辞	30
発表論文	31
引用文献	32

緒言

ウイルス感染によって引き起こされる疾患のうち、ヒトにがんを引き起こすウイルスとして、現在までに5種類が報告されている。バーキットリンパ腫を引き起こすEBウイルス、肝がんの原因であるB型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルス、子宮頸がんの病原体であるパピローマウイルス、そして、成人T細胞白血病 (ATL) を引き起こすヒトT細胞白血病ウイルス (human T-cell leukemia virus type 1 : HTLV-1) である。ウイルス感染に伴う細胞のがん化は、一般病変としてのがん発生の分子機構を知る上で一つのモデルとなりうる。ウイルスがコードするがん遺伝子産物を解析することで、細胞のがん化に重要な役割を果たす細胞内のシグナル伝達機構やタンパク質の存在が明らかとなる可能性が高い。以上の観点より、ウイルスにより引き起こされるがんの分子機構解明は、臨床的にも医学基礎研究としても非常に意義深い。

上述の5種類のウイルスのうち、レトロウイルスに分類されるHTLV-1 は、ヒトの末梢血CD4陽性T細胞に感染し、感染後、平均数十年を経て、一部のキャリアにATLを引き起こすことが疫学的な知見より明らかにされた。しかしながら、ウイルス感染に伴う細胞がん化の詳細な分子機構は未だ明らかでない。HTLV-1 にコードされる Tax は、ヒト正常T細胞を不死化する能力がある。げっ歯類の繊維芽細胞を用いた実験では、細胞をがん化することが示され、Tax は、*oncogene* として認識されている。Tax により感染宿主細胞内の様々な遺伝子発現が修飾を受け、その結果、遺伝子変異が蓄積して細胞ががん化するものと推定される。HTLV-1 のキャリアは、日本国内で約100万人前後と推定されており、1年間に500人前後が ATL を発症している。本研究は、HTLV-1 感染に伴う細胞がん化の分子機構解明を目的とし、Tax が宿主細胞に及ぼす影響を転写制御の観点より検討し、以下に示す2つの研究をおこなった。

HTLV-1 Tax によるp53ファミリータンパク質、p73, p51の転写活性化能の抑制 (第一章)、Taxが相互作用する転写コアクチベーターp300 に結合する因子の探索 (第二章)。以下これら二章の内容を論述する。

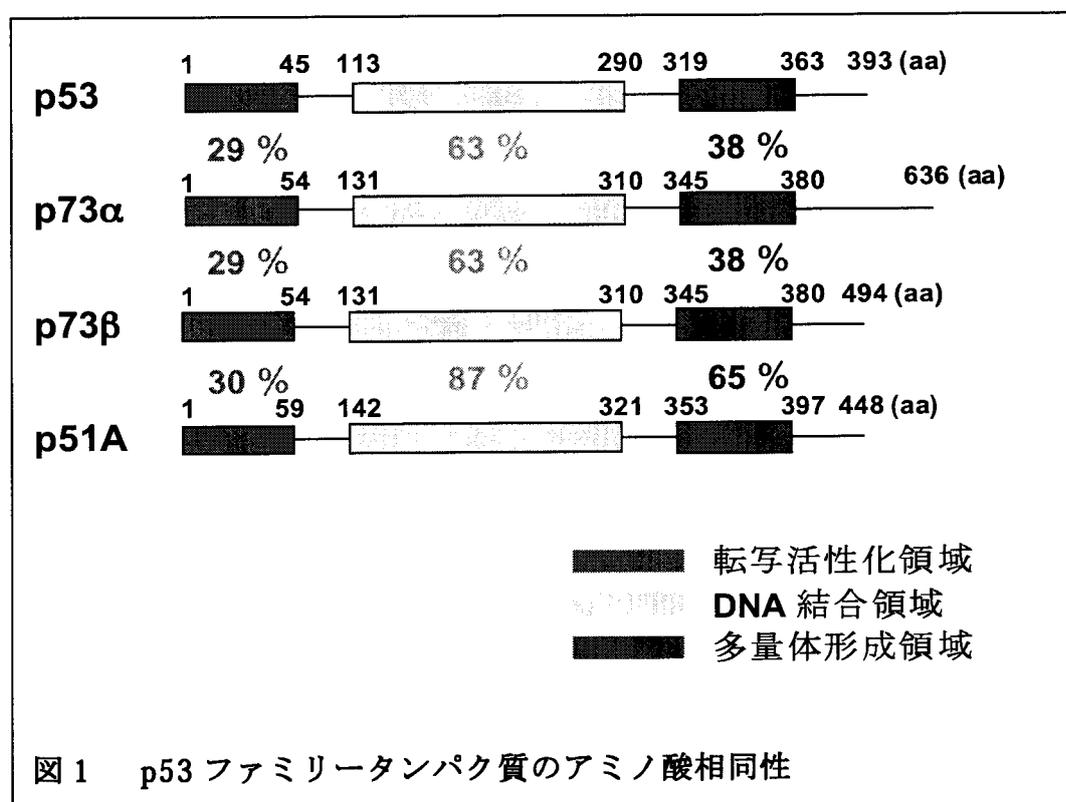
なお、本文中あるいは図表中で用いた略号は以下の通りである。

ATL	:	adult T-cell leukemia
CBB	:	coomassie brilliant blue
CBP	:	CREB-binding protein
cDNA	:	complementary DNA
CREB	:	cyclic-AMP response element-binding protein
DTT	:	dithiothreitol
EDTA	:	ethylenediaminetetraacetic acid
LTR	:	long terminal repeat
MALDI-TOF MS	:	matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
Q-TOF	:	quadrupole-time-of-flight
MLL	:	mixed lineage leukemia
MOZ	:	monocytic leukemia zinc finger protein
mRNA	:	messenger RNA
NF- κ B	:	nuclear factor κ B
PBS	:	phosphate buffered saline
PCR	:	polymerase chain reaction
PMSF	:	phenylmethylsulfonyl fluoride
PRPP	:	phosphoribosyl pyrophosphate
RNase	:	ribonuclease
SV40	:	simian virus 40
Tris	:	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

第一章

HTLV-1 Tax によるp53ファミリータンパク質p73、p51の転写活性化能の抑制

患者由来 ATL 細胞、HTLV-1 感染細胞株において、がん抑制遺伝子である p53 の機能が阻害されていることが報告されている (1)。我々の研究室では、HTLV-1 にコードされる Tax が p53 の転写活性化能を抑制することを既に報告している(2,3)。Tax による p53 の機能抑制は、細胞がん化を引き起こす要因の一つであると考えられる。p53 とアミノ酸レベルにおいて高度に相同性を有する p73、p51 が1997、1998年に相次いで報告され、p53 ファミリーを形成している(4,5) [図1]。培養細胞にp73、p51 を過剰発現した結果、細胞周期の停止、アポトーシス誘導能などp53 類似の機能およびそれぞれで特徴的な機能を多く示すことが報告されており、これら個々のタンパク質の生理的機能の解析は重要である。著者は、Tax がこれら p53 ファミリータンパク質の機能に与える影響を調べるために転写活性化能の変化を指標とした解析をおこなった。



実験方法

【材料と方法】

1. 細胞培養

Saos2 細胞 (骨肉芽腫細胞由来株、野生型 p53 欠損細胞)、COS7 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)、4 mM L-Glutamine 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (D-MEM) (NISSUI) 培地中で、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。MT-2 細胞 (HTLV-1 感染細胞株) は、10% FBS、2 mM L-Glutamine 含有 RPMI-1640 (NISSUI) 培地中で、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

2. プラスミド

pcDNA3-p53 は、Vogelstein 博士より供与された p53 発現プラスミド pC53-SN3 の p53 cDNA を pcDNA3 ベクター (Invitrogen) の *Bam* H I サイトに組み込み、構築した。p73 発現プラスミドである pcDNA3-p73 α , pcDNA3-p73 β , pcDNA3-FLAG-p73 β は、上田博士より (6)、pRcCMV-p51A, pRcCMV-p51A HA は、井川博士より分与を受けた。p51A の cDNA を以下のプライマーを用いて *pfu* DNA ポリメラーゼ (Promega) により PCR にて増幅し、制限酵素処理後、pcDNA3 の *Bam* H I / *Xho* I サイトに組み込み、pcDNA3-p51A を構築した。フォワードプライマー、リバープライマーの塩基配列は、それぞれ 5'-CGGGATCCAAGATGTCCCAGAGCACACA-3'、5'-CCGCTCGAGCTATGGGTACA CTGA-3' である。p53-RE-luc レポータープラスミドは、ルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流にインターフェロン β のプロモーターを組み込み、その上流に p53 結合コンセンサス配列を 2 つ挿入している (清野博士より分与) (7)。LTR-luc は、HTLV-1 LTR 中の Tax 応答配列 21bp を 5 回繰り返したものがルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に組み込まれている (8)。Gal4-luc には、pFR-luc (Clontech) を、NF- κ B のレポーターには、NF- κ B-luc (STRATAGENE) をそれぞれ用いた。Tax 発現プラスミドは、pH₂R-Tax、pCMV-Tax (畑中博士より分与) あるいは、pcDNA3-Tax(3) を用いた。

3. DNA トランスフェクション

Saos2 細胞、COS7 細胞には FuGENE6 (Roche) を、MT-2 細胞には SuperFect (Qiagen) を用いて DNA トランスフェクションをおこなった。

4. ルシフェラーゼアッセイ

転写活性化能は、ルシフェラーゼの酵素活性を指標とした。レポータープラスミドである p53-RE-luc を p53 ファミリータンパク質発現プラスミドおよび Tax 発現プラスミドと共に細胞にトランスフェクション後、24 時間経過してから細胞を回収し、細胞溶解液で溶解した。PBS(-)にて洗浄後、遠心し、上清を基質 (Promega) と反応させ、ルシフェラーゼの酵素活性を蛍光強度を指標としてルミノメーター(Lumat LB 9507) で測定した。

5. Gal4 融合タンパク質の作成

Tax が p53 同様に p73, p51 の転写活性化ドメインを介して転写活性化能を抑制するか検討するため p53 ファミリータンパク質の転写活性化ドメインと Gal4 DNA 結合ドメインとの融合タンパク質を作成した。p53NS (1-52aa), p53NL (1-105aa), p73NS (1-54aa), p73NL (1-125aa), p51NS (1-59aa), p51NL (1-135aa)の領域をそれぞれ *pfu* DNA ポリメラーゼを用いて PCR により増幅し、Gal4 DNA 結合ドメイン発現プラスミドである pM ベクター(CLONTECH) の *Bam* HI / *Hind* III サイトに挿入した。PCR 用フォワードプライマー、リバープライマーの塩基配列はそれぞれ以下に記す。p53NS (1-52aa) : 5'-CGCGGATCCCCATGGAGGAGCCGCAGTCA-3'、5'-CCCAAGCTTTTGTTC AATATCGTCCGGGGA-3'、p53NL (1-105aa) : 5'-CGCGGATCCCCATGGAGGAGCCGCAGTCA-3'、5'-CCCAAGCTTGCCCTGGTAGGTTTTCTGGGA-3'、p73NS (1-54aa) : 5'-CGCGGATCCCCATGGCCCAGTCCACCGCC-3'、5'-CCCAAGCTTCAGGTGGAAGACGTCCATGCT-3'、p73NL (1-125aa) : 5'-CGCGGATCCCCATGGCCCAGTCCACCGCC-3'、5'-GACCCAAGCTTGTGGGGTCCGGGGTAGTCGGT-3'、p51NS (1-59aa) : 5'-CGCGGATCCCCATGTCCCAGAGCACACAG-3'、5'-CCCAAGCTTCATGCGGATACAGTCCATGCT-3' p51NL (1-135aa) : 5'-CGCGGATCCCCATGTCCCAGAGCACACAG-3'、5'-CCCAAGCTTCGGGCCTGGGTAGTCGGTTT-3'。

6. 免疫沈降実験

p53、FLAG-p73 β 、p51A-HA および Tax 発現プラスミドを COS7 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後、24 時間経過した後、放射性同位体 [³⁵S]-Methionine (ICN, 3.7MBq/ml) を用いて代謝標識を開始し、6 時間後サンプルを回収した。それぞれの細胞を細胞溶解液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 1 mM DTT, 1 mM PMSF) で 4°C、1 時間、処理した。その後、抗 p53 抗体 (PAb 1801, Ab-2, Calbiochem)、抗 FLAG 抗体 (M2, SIGMA)、抗 HA 抗体 (12CA5, Roche)、抗 Tax 抗体 (MI 73, (9)) を加えて 4°C、1 時間、回転混和した。Protein-G-Sepharose (Amersham Biosciences) を加えて 4°C、1 時間、回転混和した後、遠心し、得られた免疫沈降物について、細胞溶解液で 5 回、洗浄した。遠心後、上清を除き、1×Laemmli sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 0.1% bromophenol blue (BPB), 10% glycerol, 5% 2-Mercaptoethanol) を加え、100°C、5 分間タンパク質を変性させた後、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にてタンパク質を分離した。ゲルを固定液 (30% Methanol, 10% 酢酸) で固定し、乾燥後、イメージアナライザー-BAS2000 で解析をおこなった。

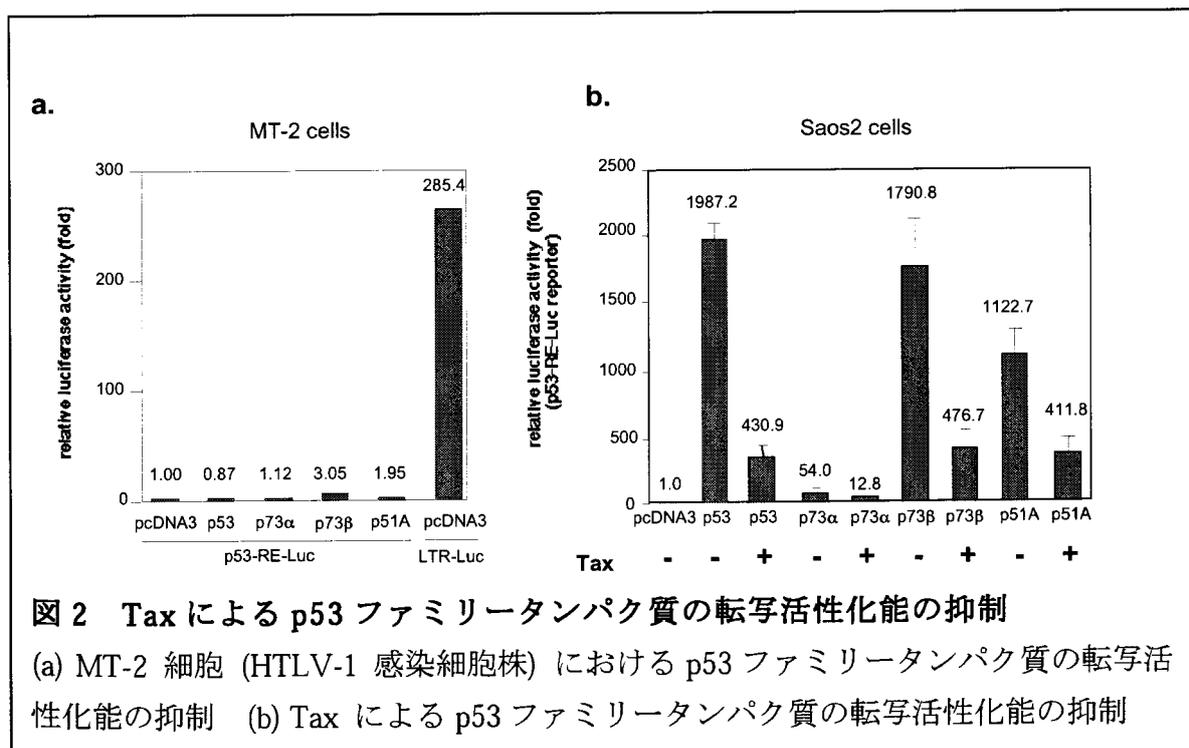
実験結果

(1) HTLV-1 感染細胞株 MT-2 細胞における p53 ファミリータンパク質 (p73 α , p73 β , p51A) の転写活性化能の抑制

MT-2 細胞 (3.0×10^6 個 / 60 mm dish, falcon) に p53-RE-luc を 0.5 μ g、pcDNA3-p53, pcDNA3-p73 α , pcDNA3-p73 β , pcDNA3-p51A を 2.0 μ g、SuperFect を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後、24 時間経過した後、ルシフェラーゼアッセイをおこなった。その結果、ポジティブコントロールである LTR-luc では十分な活性が確認されたが p73, p51 の転写活性化能は p53 同様に抑制されていた [図 2 (a)]。

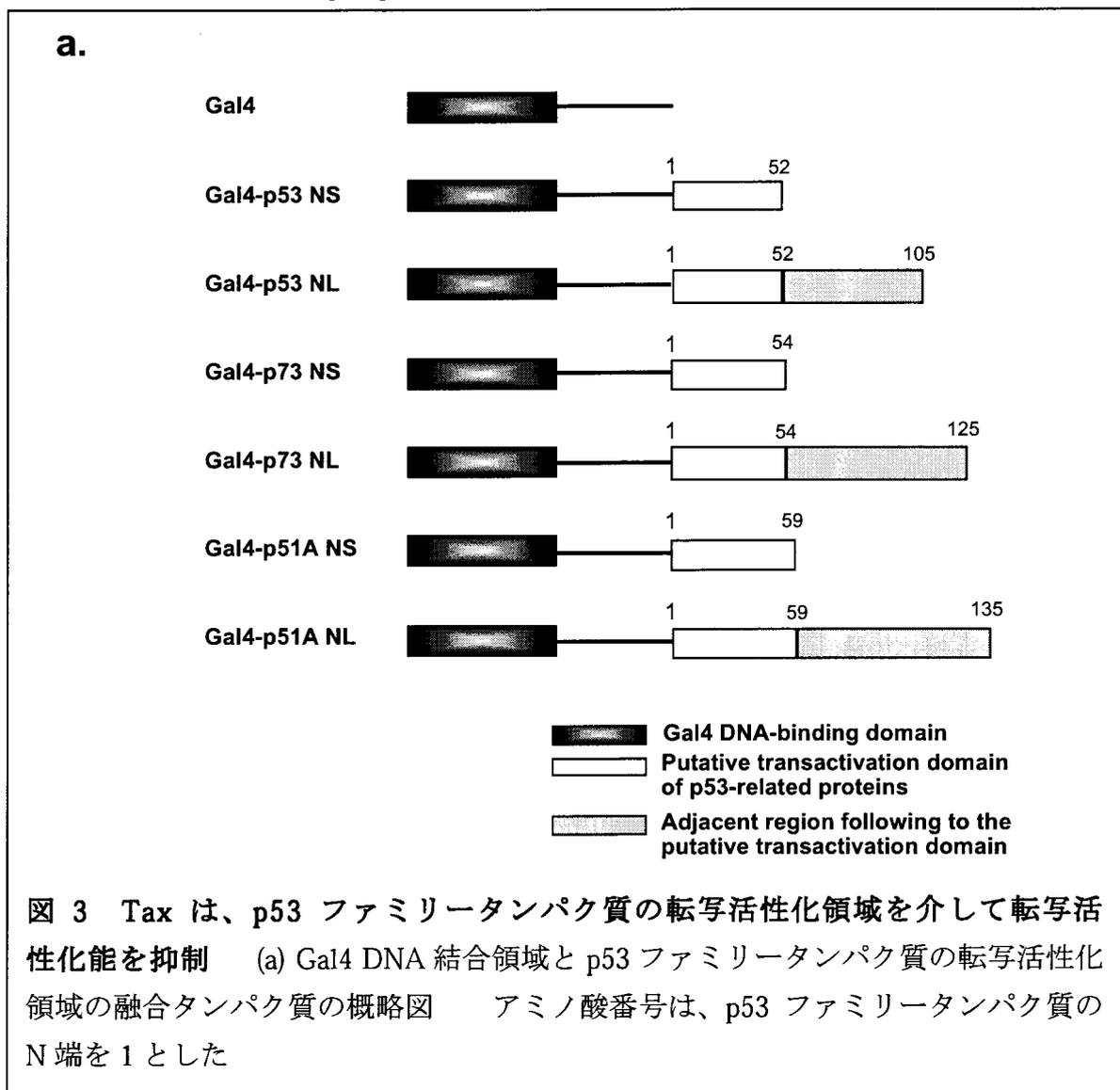
(2) Tax による p53 ファミリータンパク質の転写活性化能の抑制

Saos2 細胞 (1.0×10^5 個/well、6-well plate, Falcon) に 0.1 μ g の p53-RE-luc、0.2 μ g の p53 ファミリータンパク質発現プラスミド、0.4 μ g の pH₂R-Tax を FuGENE6 を用いてトランスフェクションした。24 時間後、ルシフェラーゼアッセイをおこなった。その結果、Tax により p53 ファミリータンパク質の転写活性化能は抑制された [図 2 (b)]。



(3) Tax は、p53 ファミリータンパク質の転写活性化ドメインを介して
転写活性化能を抑制する

Tax が p53 ファミリータンパク質のどの領域に作用して転写活性化能を抑制するか検討するため、Gal4 DNA 結合領域と p53 ファミリータンパク質との融合タンパク質を作製した [図 3 (a)]。Saos2 細胞 (1.0×10^5 個/well、6-well plate) に 0.1 μ g の Gal4-luc、0.2 μ g の Gal4 融合タンパク質発現プラスミド、0.4 μ g の pH₂R-Tax を FuGENE6 を用いてトランスフェクションした。24 時間後、ルシフェラーゼアッセイをおこなった。その結果、Tax により p53 ファミリータンパク質の転写活性化能は、pM-p73NS 以外では、有意に抑制された [図 3 (b)]。



b.

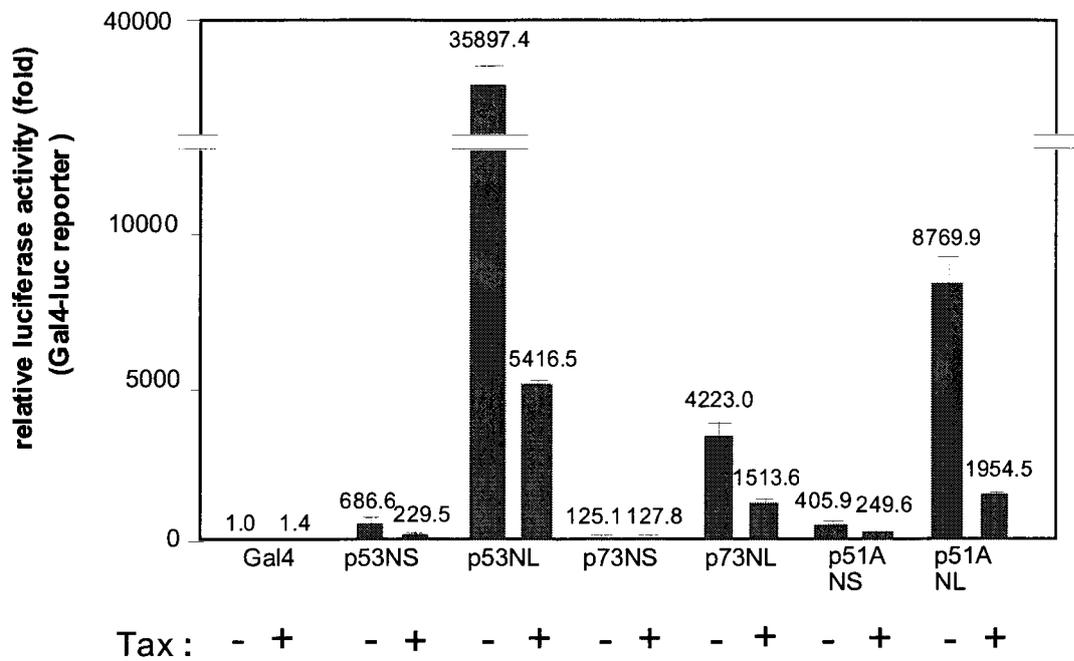
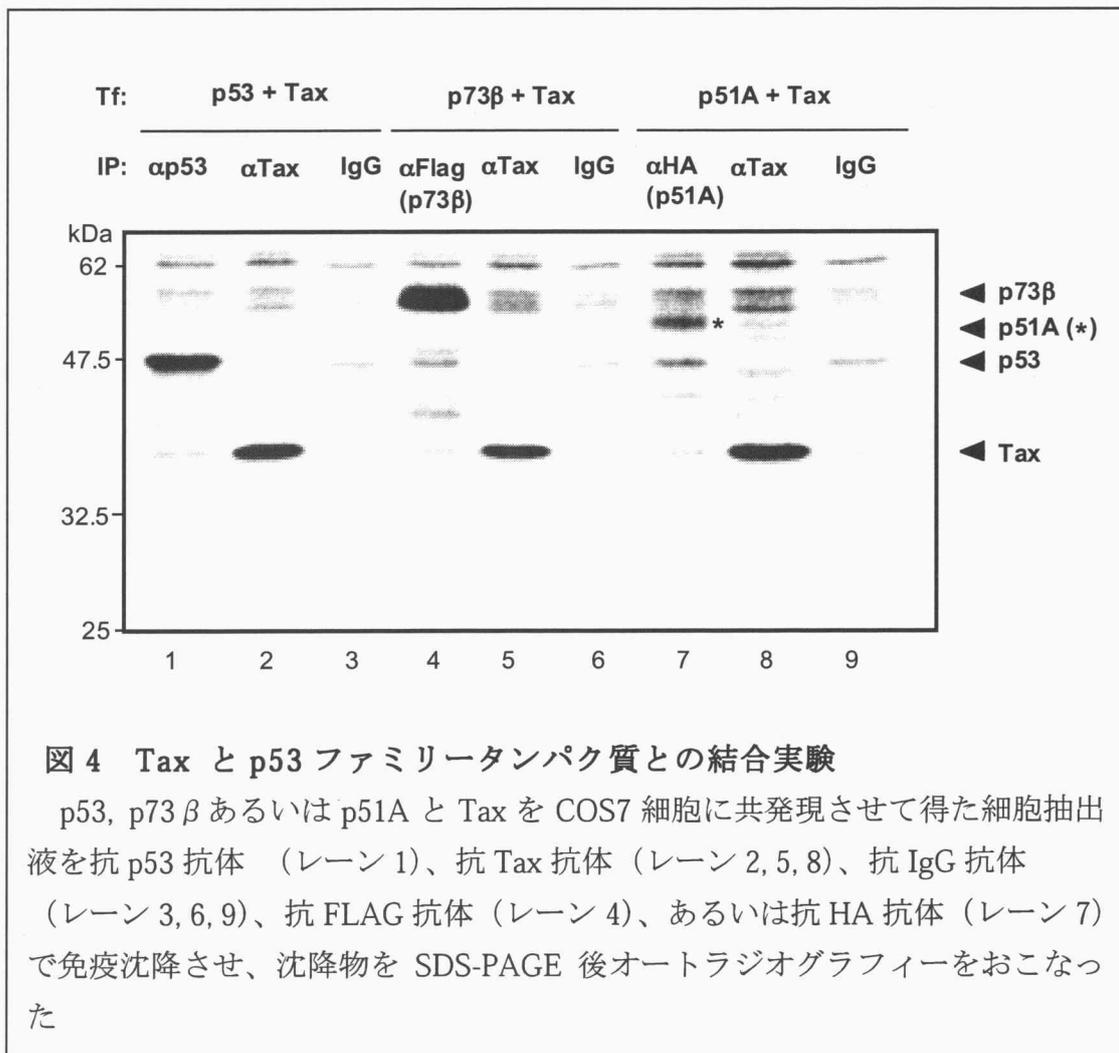


図 3 (b) Tax は、p53 ファミリータンパク質の転写活性化領域に作用して転写活性化能を抑制する。バー上の数字は、Gal4 を Tax なしで発現させたときのルシフェラーゼ活性を 1 としたときの相対値を示す。

(4) Tax は、p53 ファミリータンパク質と直接結合することなく、転写活性化能を抑制する

COS7 細胞に p53, FLAG-p73 β , p51A-HA、Tax 発現プラスミドをそれぞれトランスフェクションし、24 時間後から放射性同位体 [³⁵S]-Methionine を用いて代謝標識をおこなった。細胞抽出液をそれぞれの抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE 後解析したところ、Tax と p53 ファミリータンパク質は、図 4 にみられるように共沈しなかったことから、Tax は、p53 ファミリータンパク質に直接結合せず、転写活性化能を抑制することが示唆された。



(5) Tax 変異体(K88A)は、p53 ファミリータンパク質の転写活性化能を抑制しない

Tax がどのような機構で p53 ファミリータンパク質の転写活性化能を抑制するかを調べるために Tax の変異体を用いた解析をおこなった。N 端から 88 番目のリジンがアラニンに変化した Tax は、HTLV-1 LTR からの転写を活性化できないことが知られている(10)。0.1 μg の LTR-luc または NF- κB luc レポータープラスミドを転写コアクチベーターCBP および p300 と結合できない Tax 変異体(K88A) 発現プラスミドである pcDNA3-Tax (K88A) 0.2 μg と共に Saos2 細胞 (1.0×10^5 個/well、6-well plate) に FuGENE6 を用いてトランスフェクションした。24 時間後、ルシフェラーゼアッセイをおこなった結果、Tax 変異体(K88A) は報告通り CREB を介した経路は活性化しなかったが NF- κB を介した経路は活性化した [図 5 (a) (b)]。Tax 変異体(K88A)が p53 ファミリータンパク質の転写活性化能に与える影響を検討するため、Saos2 細胞 (1.0×10^5 個/well、6-well plate) に 0.1 μg の p53-RE-luc、0.2 μg の p53 ファミリータンパク質発現プラスミド、0.2 μg の pcDNA-Tax、pcDNA3-Tax(K88A) を FuGENE6 を用いてトランスフェクションした。その結果、Tax(K88A) は、p53 ファミリータンパク質の転写活性化能をほとんど抑制しなかった [図 5 (c)]。

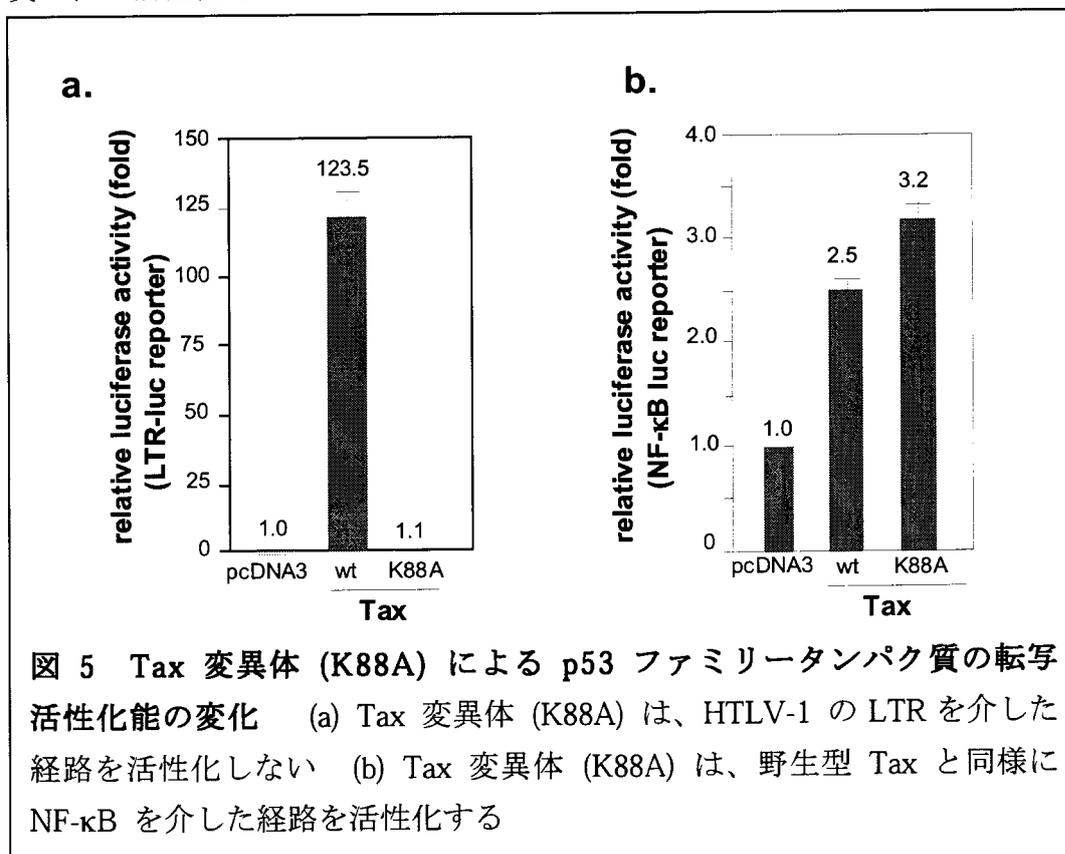


図 5 Tax 変異体 (K88A) による p53 ファミリータンパク質の転写活性化能の変化 (a) Tax 変異体 (K88A) は、HTLV-1 の LTR を介した経路を活性化しない (b) Tax 変異体 (K88A) は、野生型 Tax と同様に NF- κB を介した経路を活性化する

C.

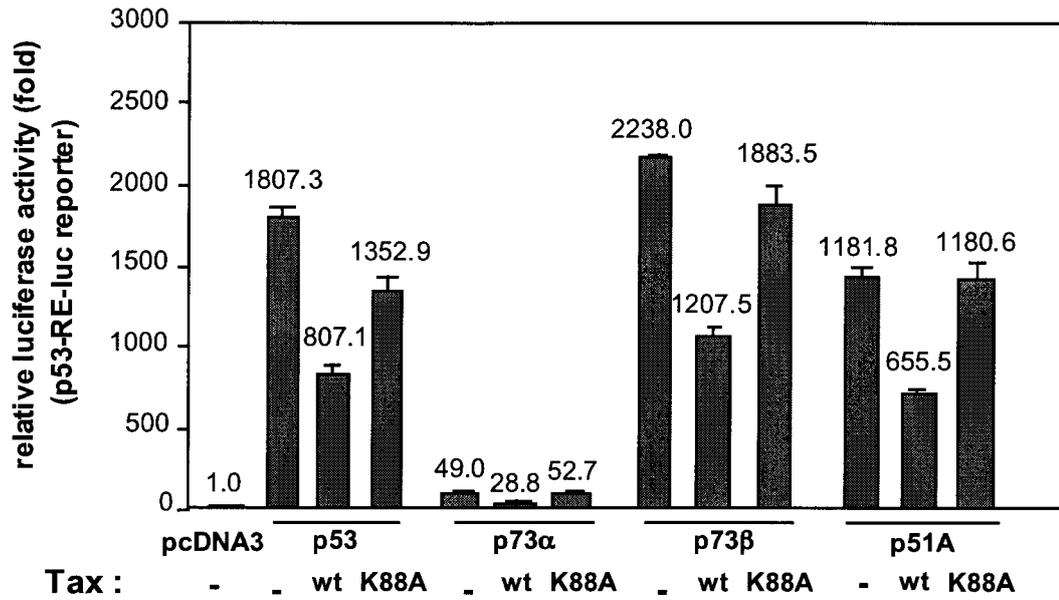


図 5 (c) Tax 変異体 (K88A) による p53 ファミリータンパク質の転写活性化能の変化

考察

SV40 T 抗原やヒトパピローマウイルスの E6、アデノウイルス E1B、E4orf6 など DNA 腫瘍ウイルスがコードするがん遺伝子産物は、p53 と直接結合することで p53 の機能阻害を引き起こすことが知られている(11-17)。しかし、E4orf6 以外は、p73 の転写活性化能を抑制しないことが報告されている(18-21)。なお、E4orf6 に関しては、p73 の C 末端に直接結合して、転写活性化能を抑制する(18,21)。本研究において著者は、Tax が p53 同様、p73, p51 の転写活性化能を抑制することを明らかにした。特に、p51 がウイルス性がん遺伝子産物（この場 Tax）により転写活性化能が抑制されることを見出したのは、はじめてである。また、Tax が p53 ファミリータンパク質と直接結合せず、それらの転写活性化能を抑制することが示唆されたことから、直接結合に転写活性を抑制することが知られている E4orf6 や他のウイルス由来タンパク質とは、作用する機構が異なることを示している。転写コアクチベーターである CBP および p300 との結合能を欠いた Tax 変異体 (K88A) を用いた実験より、Tax 変異体(K88A)は、p53 同様、p73, p51 の転写活性化能を抑制することができないことがわかった。このことから Tax による p53 ファミリータンパク質の転写活性化能の抑制は、Tax が CBP/p300 と相互作用することが重要であることが示唆された。このことは、CBP/p300 が p53、p73 の N 末端にある転写活性化領域に作用して、転写の増強を引き起こすこと、さらに Tax が p53 ファミリータンパク質の転写活性化領域を介して抑制作用を示すことから示唆される。Gal4 と融合させた p53 ファミリータンパク質の転写活性化領域の解析実験より、putative な転写活性化領域だけでは、十分な転写活性を示さないことが示唆された。他のグループの報告にもあるように p53 に関しては、第二の転写活性化領域の存在が示唆されている(22,23)。今回の実験で p73, p51 にもそのような領域の存在が示唆された。最近、Tax による p53 の転写活性化能には、Tax による CREB 経路の活性化が重要であることが報告されている(3,24)。また、野生型の Tax は、CREB、NF- κ B を介した経路を活性化することが知られている。Tax 変異体 (K88A) は、NF- κ B 経路を活性化する能力は保持しているが CREB 経路を活性化する能力を欠失している(10)。Tax 変異体(K88A) が p53 ファミリータンパク質の転写活性化能を抑制できないことから、Tax による CREB 経路の活性化が p53 ファミリータン

パク質の転写活性化能の抑制に重要であることが示唆された。Tax による Rat-1 細胞のトランスフォームには、恒常的な NF- κ B 経路の活性化が重要であるという報告がある(9)。一方で、Tax による CREB 経路の活性化がリンパ球細胞の不死化に必須であるという報告もある(8,25,26)。Tax は、PCNA と結合し、その機能阻害が宿主細胞染色体の突然変異発生率を上昇させると示唆されている(27,28)。Tax による p53 の機能阻害は、p53 の本来の役割を考えると宿主細胞へ突然変異を導入したり、染色体不安定性を引き起こすと考えられる。p73、p51 の機能は p53 のそれと完全におなじではないにせよ、類似の機能も持つことを考えると宿主染色体へ何らかの異常を与えることが推定される。同様に p53 とは明らかに異なる機能をあわせ持つことから、これらの特有の働きに対して Tax が影響を及ぼし、それが細胞の不死化あるいはがん化の原因のひとつになる可能性が考えられる。

第二章

Taxが相互作用する転写コアクチベーターp300に結合する因子の探索

CBPは、転写因子である CREB に、p300は、アデノウイルス E1Aに結合する因子としてそれぞれ単離された(29,30)。CBP と p300 は、それぞれマウスとヒトよりその遺伝子が同定された。各々2441、2414アミノ酸残基からなり、プロモドメイン、3つのCysteine/Histidine (C/H) リッチドメイン、KIXドメイン、Glutamine (Q) -リッチドメイン、histone acetyltransferase (HAT) ドメインなどシヨウジョウバエから哺乳類までよく保存された複数のモチーフを有している。CBP、p300 は、これらの機能領域を介して種々の転写因子と結合し、転写コアクチベーターとして機能することが知られている。これらの機能領域におけるアミノ酸相同性は、80% 以上であり、現在までに CBP と p300 の間での類似の機能が多く報告されている。Tax は CBP/p300 のKIX 領域に結合する。この領域は Tax 以外にも種々の転写因子などが結合する hot spot のひとつである。一方、CBP とp300 のKIX領域のアミノ酸配列の相同性は高いものの 100% 一致ではない。KIX 領域が種々のタンパク質と相互作用すること、CBP と p300 とでこの領域のアミノ酸配列に違いがあることを考えると、CBP あるいは p300 の KIX 領域を特異的に認識して結合するタンパク質の存在が予想された。そこで、この KIX 領域に相互作用する新規細胞性因子の探索を目的に CBP/p300 の KIX 領域を含む領域を Glutathione S-transferase (GST) と融合タンパク質を作製し、GST-pull down assay により結合する細胞性タンパク質のスクリーニングをおこなった。

実験方法

【材料と方法】

1. 細胞培養

Jurkat 細胞、MCF7 細胞は、10% FBS、2 mM L-Glutamine 含有 RPMI-1640 培地中で、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。NIH3T3 細胞は、10% FBS、4 mM L-Glutamine 含有ダルベッコ変法イーグル (D-MEM) 培地中で、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

2. GST-pull down assay

CBP, p300 の CH1~KIX 領域をそれぞれ *pfu* DNA ポリメラーゼを用いて PCR によって増幅後、CBP (CH1~KIX) 領域 (362aa~682aa) を pGEX-6p-1 (Amersham Biosciences) の *Bam* HI/*Xho* I サイトに、p300 (CH1~KIX) 領域 (338aa~661aa) を pGEX-6p-2 の *Sma* I/*Xho* I サイトにそれぞれ組み込んだ。PCR に用いたフォワードプライマー、リバースプライマーは、それぞれ以下の通りである。CBP(CH1~KIX) : 5'-CGCGGATCCCATGCCACAAATGT-3'、5'-CCGCTCGAGCTATGGCTGGTTACCCAG-3'、p300(CH1~KIX) : 5'-TCCCCCGGGATCCAGCAGCAGCTT-3'、5'-CCGCTCGAGCTAAGCATTGTTAGCAT-3'。作製したGST融合タンパク質発現プラスミド、pGEX-6p-1, pGEX-6p-1-CBP (CH1~KIX)、pGEX-6p-2-p300 (CH1~KIX) を大腸菌 BL21株 (Stratagene) に遺伝子導入し、100 μM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside (IPTG)、20°C、16時間浸透培養し、GST, GST-CBP (CH1~KIX), GST-p300 (CH1~KIX) それぞれのタンパク質発現誘導をおこなった。発現誘導後、大腸菌を溶解液 [50 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF] に懸濁後、フレンチプレスを用いて、菌体を破碎した。遠心後上清をとり、PBST [0.5% TritonX-100 を含む PBS (-) (2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄)] で平衡化した樹脂 (Glutathione Sepharose 4B) に4°C、1 時間、回転混和して吸着させた。遠心後、上清を除き、PBST で2回、binding buffer [10 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% NP-40] で 3 回洗浄した。一方、1×10⁷ 個のJurkat 細胞を [³⁵S]-Methionine (ICN, 3.7MBq/ml) を用いて、6時間代謝標識をおこなった後、binding buffer にて細胞を溶解した。遠心後、上清を GST融

合タンパク質と Glutathione Sepharose 4B の複合体に加え、4°C、1 時間、回転混和した。binding buffer にて 4 回洗浄後、2×Lammie sample buffer を加え、5 分間、100°C 処理し、タンパク質を変性させた。SDS-PAGE によりタンパク質を分離後、ゲルを固定液で固定し、乾燥後、イメージアナライザーBAS5000にて解析した。

3. 二次元電気泳動

膨潤剤 [8M Urea, 0.5% TritonX-100, 10 mM DTT, 0.18% pharmalyte (pH3-10, Amersham Biosciences), 0.001% Orange G] を用いて、Immobiline DryStrip [pH3-10L (13 cm) (Amersham Biosciences)] を膨潤化した。1×10⁷ 個の Jurkat 細胞を細胞溶解液 [10 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40] を用いて溶解し、遠心後の上清を Glutathione Sepharose 4B と結合した GST 融合タンパク質 [GST, GST-p300 (CH1~KIX), GST-CBP (CH1~KIX)] に等量ずつ加え、4°C、1 時間、回転混和した。細胞溶解液で 4 回洗浄後、展開用バッファー [8M Urea, 3.6% pharmalyte (pH3-10), 2% NP-40, 10% 2-Mercaptoethanol] にて 37°C、30 分間処理した。遠心後、上清を Immobiline DryStrip にアプライし、Multiphor II IEF System (Amersham Biosciences) にて等電点電気泳動をおこなった。等電点電気泳動後の Immobiline DryStrip を平衡化用バッファー [62.5 mM Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 0.00125% BPB, 5% 2-Mercaptoethanol] を用いて平衡化した。SDS-PAGE ゲル上に、平衡化処理した Immobiline DryStrip を乗せ、0.5% アガロースを含む平衡化バッファーで固定後、SDS-PAGE をおこなった。泳動後、ゲルを固定液で固定し、乾燥後、イメージアナライザーBAS5000 により解析をおこなった。

4. タンパク質の質量解析

1×10⁹ 個の Jurkat 細胞の細胞抽出液を用いて、Glutathione Sepharose 4B と結合した GST-p300 (CH1~KIX) を用いて GST-pull down をおこなった。得られたサンプルを二次元電気泳動にて分離後、ゲルを Coomassie Brilliant Blue R-250 染色液 (CBB) 染色液で染色した。標的タンパク質のスポットを切り出し、ゲル片をリジルエンドペプチダーゼで酵素処理した。ゲルより抽出し、MALDI-TOF MS および Q-TOF で質量解析をおこない、タンパク質を同定した。質量解析は、大阪大学蛋白質研究所 有機化学部門の高尾敏文先生に依頼し、共同研究によ

り解析をおこなった。

5. PRS1 のクローニング

mRNA Isolation Kit (Roche) を用いて、Jurkat 細胞より mRNA を回収した。回収した mRNA を鋳型とし、逆転写用プライマー 5'-TGTGGGATGTAGAAAGCTAC-3' を用いて SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogene) にて逆転写をおこなった。得られた逆転写産物を鋳型として、フォワードプライマー：5'-CGGGATCCAGGATGCCGAATATCAAAATC-3'、リバープライマー：5'-CCGCTCGAGTTATAAAGGGACATGGCTGAATAG-3' を用いて *pfu* DNA ポリメラーゼにより PRS1 の cDNA を PCR にて増幅した。制限酵素処理後、pcDNA3 の *Bam* HI / *Xho* I サイトに組み込んだ。同様にして、PRS2 もフォワードプライマー：5'-CGGGATCCAAGATGCCCAACATC GTGCTGTTC-3'、リバープライマー：5'-CCGCTCGAGTTATAAAGGGACA TGGCTGAATAG-3' を用いてクローニングをおこなった。

6. プラスミド

GST 融合タンパク質の作成

GST-p300(KIX)(436aa~661aa), GST-CBP(KIX)(451aa~682aa), GST-p300(567aa~661aa), GST-p300(567aa~652aa), GST-p300(576aa~661aa), GST-p300(576aa~652aa), GST-p300(604aa~661aa) については対応する領域を PCR にて増幅後、GST 融合タンパク質発現ベクターに組み込み、大腸菌 BL21 株を用いて発現させ、さらにアフィニティーカラムを用いてタンパク質を部分調製した。

PRS1, PRS2 のキメラタンパク質発現プラスミドの作成

chimera-1 [PRS2 (1aa~170aa), PRS1(171aa~318aa)], chimera-2 [PRS2 (1aa~190aa), PRS1(191aa~318aa)], chimera-3 [PRS2 (1aa~245aa), PRS1(246aa~318aa)], chimera-4 [PRS2 (1aa~265aa), PRS1(266aa~318aa)] のキメラタンパク質発現プラスミドを以下の方法で作製した。キメラタンパク質の N 端部分を構成する PRS2 の領域をそれぞれに対応する以下に示すフォワードプライマー、リバープライマーを用いて *pfu* DNA ポリメラーゼにより PCR にて増幅した。PRS2 (1aa ~ 170aa): 5'-CGGGATCCAGGATGCCGAATATCAAAATC-3', 5'-AGCTCCACCAGCATCAGGTGAAACAATGAT -3', PRS2 (1aa ~ 190aa): 5'-CGGGATCCAGGATGCCGAATATCAAAATC-3', 5'-TTCTTTGTGAATCAAAGC

AAATTCCACATT -3', PRS2 (1aa~245aa): 5'-CGGGATCCAGGATGCCAATATC AAAATC-3', 5'-ATGAGTCAAGATGGCATACTTTGGTGGC -3', PRS2: (1aa~265aa): 5'-CGGGATCCAGGATGCCGAATATCAAAAATC-3', 5'-TACTACTGCCTC AAAGGCGGCATTATTTAT-3'。同様にキメラタンパク質の C 端部分を構成する PRS1 の対応する領域を同様に以下に示すフォワードプライマー、リバースプライマーを用いて *pfu* DNA ポリメラーゼにより PCR にて増幅した。PRS1(171aa~318aa) : 5'-ATCATTGTTTCACCTGATGCTGGTGGAGCT-3', 5'-CCGCTCGAGTTATAAAGGGACATGGCTGAATAG-3', PRS1(191aa~318aa): 5'-AATGTGGAATTTGCTTTGATTCACAAAGAA -3', 5'-CCGCTCGAGTTATAAAGGGACATGGCTGAATAG-3', PRS1(246aa~318aa): 5'-GCCACCAAAGTGTATGC CATCTTGACTCAT -3', 5'-CCGCTCGAGTTATAAAGGGACATGGCTGAATAG-3', PRS1(266aa~318aa): 5'-ATAAATAATGCCGCCTTTGAGGCAGTAGTA -3', 5'-CCGCTCGAGTTATAAAGGGACATGGCTGAATAG-3'。各々の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動後、増幅された DNA 断片を GENE CLEAN II KIT (BIO 100) を用いて回収、精製した。作製するキメラタンパク質の N 端側、C 端側に対応する DNA 断片をそれぞれ等量混合した後、フォワードプライマー: 5'-CGGGATCCAGGATGCCGAATATCAAAAATC-3'、 リバースプライマー: 5'-CCGCTCGAGTTATAAAGGGACATGGCTGAATAG-3' にて PCR をおこない、制限酵素処理後、pcDNA3 の *Bam* HI / *Xho* I サイトに組み込みキメラタンパク質発現プラスミドを作製した。

Gal4、VP16 融合タンパク質の作成

Gal4 DNA 結合ドメイン発現プラスミドである pM ベクターの *Bam* HI / *Sal* I サイトに PRS1 の cDNA を組み込み、pM-PRS を構築した。Talianidis 博士より分与された pcDNA3-CBP、Livingston 博士より供与された pCMV-p300 および pcDNA3-PRS1 より各々の cDNA を切り出し、pVP16 (CLONTECH) に組み込み pVP16-CBP、pVP16-p300、pVP16-PRS1 を構築した。

7. *in vitro* 結合実験

in vitro での PRS1 および PRS2, PRS1 と PRS2 のキメラタンパク質の作製は、T_NT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) を用いておこなった。ウサギ網状赤血球の抽出液 20 μ l に pcDNA3-PRS1, pcDNA3-PRS2 あるいは pcDNA3-PRS1 キメラを 0.25 μ g、放射性同位体の L-[³⁵S]-Methionine (15

mCi/ml) (Amersham Biosciences) を 1 μ l 加え、30°C、90 分間 反応させた。*in vitro* 合成産物 2 μ l を GST-pull down assay に用い、結合実験をおこなった。600 μ l の binding buffer [10 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% NP-40] に Glutathione Sepharose 4B と複合体を形成した GST 融合タンパク質、標識した *in vitro* 合成産物を加え、4°C、1 時間、回転混和した。binding buffer で 5 回洗浄後、1×Laemmli sample buffer で懸濁し、100°Cで 5 分間タンパク質を変性し、SDS-PAGE によってタンパク質を分離した。ゲルを固定液にて固定後、乾燥させた後、イメージアナライザー BAS5000 により解析をおこなった。

8. DNA トランスフェクション

MCF7 細胞には FuGENE6 を用いて DNA トランスフェクションをおこなった。

9. ルシフェラーゼアッセイ

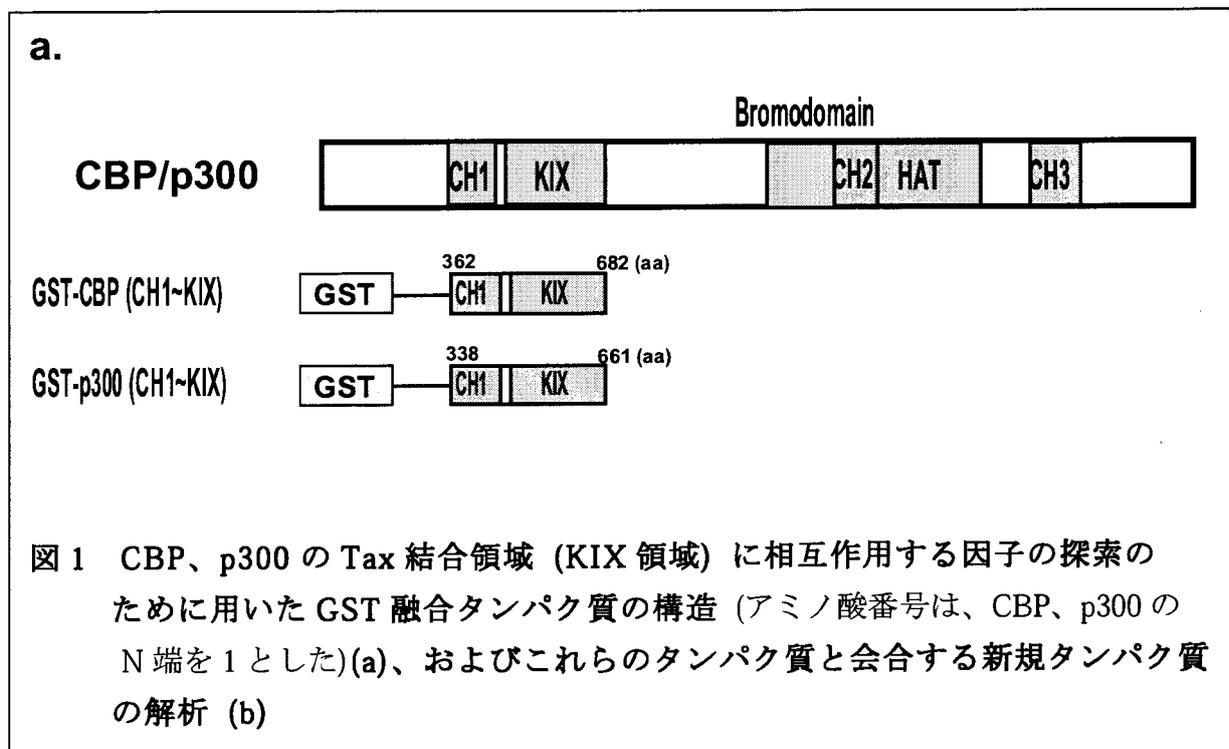
転写活性化能は、ルシフェラーゼの酵素活性を指標とした。レポータープラスミドである Gal4-luc および Gal4 融合 PRS1、VP16-CBP、VP16-p300 発現プラスミドと共に MCF7 細胞にトランスフェクション後、48 時間経過してから細胞を回収し、細胞溶解液で溶解した。遠心後、上清を基質と反応させ、ルシフェラーゼの酵素活性を蛍光強度を指標としてルミノメーターで測定した。

実験結果

第 1 節 p300 (CH1~KIX)領域特異的に結合する因子の同定

1. GST-pull down assay による CBP(CH1~KIX)領域、p300(CH1~KIX) 領域に相互作用する因子の探索

放射性同位体 [³⁵S]-Methionine にて代謝標識した Jurkat 細胞抽出液を用いて、GST-CBP(CH1~KIX), p300 (CH1~KIX) [図 1 (a)] を用いて GST-pull down assay をおこなったところ、GST には結合せず、CBP、p300 それぞれの CH1~KIX 領域に特異的に会合する因子の存在が示唆された。これらのうち、CBP (CH1~KIX) 領域には結合せず、p300 (CH1~KIX) 領域特異的に相互作用する約 34 kDa のタンパク質が存在が判明した [図 1 (b)]。NIH3T3 細胞、MCF7 細胞を用いた実験においても同様の因子の存在が確認されたことから、p300(CH1~KIX) 領域に特異的に会合するタンパク質の存在が確認され、それが種を越えて存在することが示された。そこで、この因子に着目し、タンパク質の分離、同定を試みた。



b.

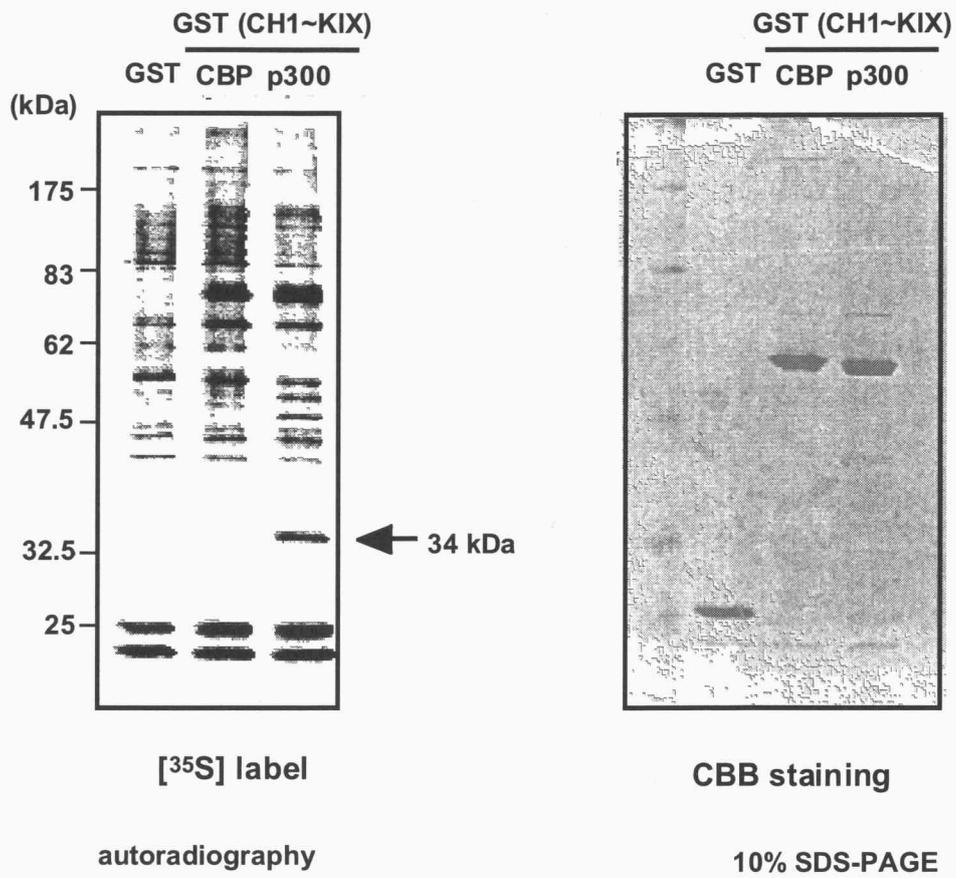


図 1 (b) GST-pull down assay による GST 融合タンパク質 (CBP (CH1~KIX), p300 (CH1~KIX)) と会合する因子の探索

2. 二次元電気泳動による標的タンパク質の分離および質量解析による 標的タンパク質の同定

放射性同位体 [³⁵S]-Methionine にて代謝標識した 1×10^7 個 Jurkat 細胞抽出液を用いて、GST-CBP(CH1~KIX), p300 (CH1~KIX) と結合するタンパク質の単離を GST-pull down assay でおこない、得られた標品を二次元電気泳動により分離した [図 2]。その結果、GST-p300 (CH1~KIX) 領域に相互作用する 34kDa のタンパク質は、単一スポットとして分離されることが判明した [図 2 ☆印]。標的タンパク質を大量調製するため、 1×10^9 個の Jurkat 細胞抽出液を用いて、同様の実験を行い、CBB 染色液を用いて二次元電気泳動後のゲルを染色した。単一スポットに染まった 34kDa のタンパク質をリジルエンドペプチダーゼによる酵素処理後、ゲルより抽出し、MALDI-TOF MS、Q-TOF により質量解析をおこなった。その結果、標的タンパク質は、核酸生合成に参与する phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 (PRS1) であることが判明した。

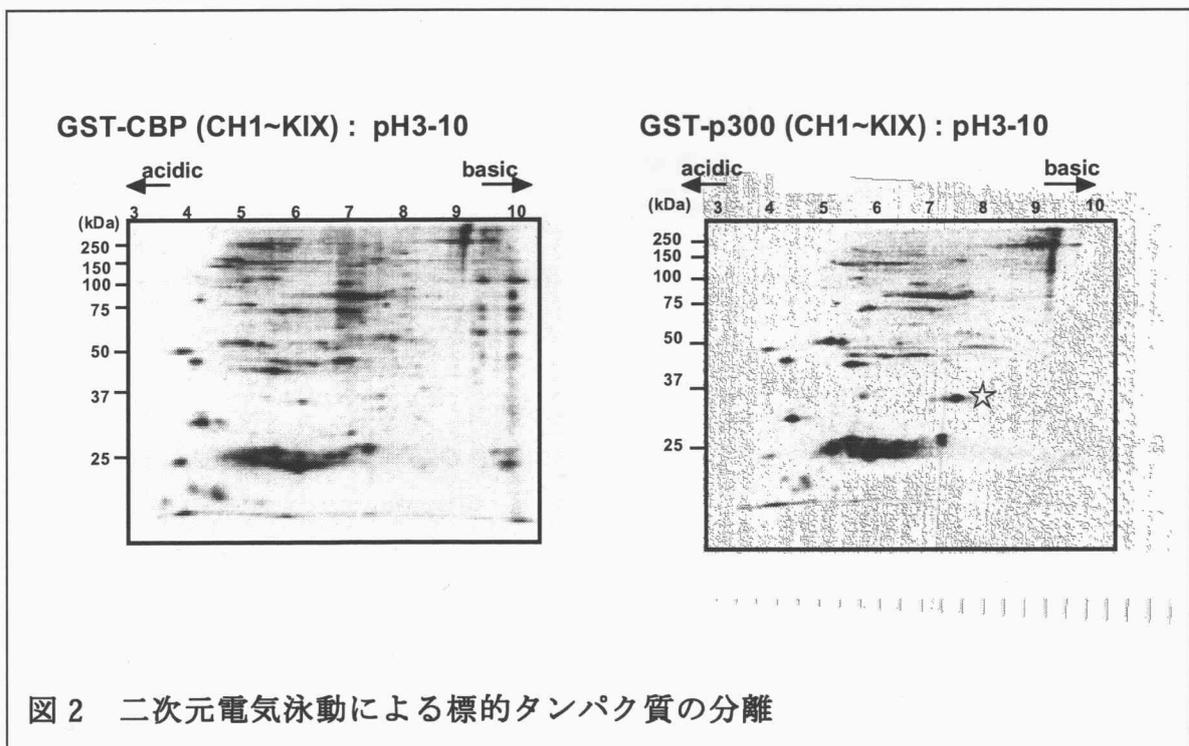


図 2 二次元電気泳動による標的タンパク質の分離

第2節 p300 と PRS1 の結合実験

1. *in vitro* における PRS1 と p300 (CH1~KIX) 領域の結合確認実験

および p300 分子内の PRS1 最小結合領域の決定

ウサギ網状赤血球の抽出液を用いて、放射性同位体 [³⁵S]-Methionine 存在下、*in vitro* 合成した PRS1 と等量の GST 及び GST-CBP (CH1~KIX) 領域、GST-p300 (CH1~KIX) 領域をインキュベートした結果、GST 単独及び GST-CBP (CH1~KIX) では相互作用が見られないのに対して、GST-p300 (CH1~KIX) では PRS1 と相互作用していることが確認された [図3 (a)]。次に、p300(CH1~KIX) 領域のどの部分に相互作用するか検討した。まず、p300 の CH1 領域 (338 アミノ酸から424アミノ酸：以下、338aa~424aaと記述) と KIX 領域 (436aa~661aa) のどちらに結合するか検討した。その結果、p300 の CH1 領域のみでは PRS1 との結合が見られず、KIX 領域でのみ結合が確認された。CBP と p300 は KIX 領域において、C 端側がアミノ酸配列の相同性が高い。そこで、KIX 領域を N 端側から削った変異体タンパク質を作成し、PRS1 との結合を調べた。その結果、GST-p300 (567aa~661aa) では結合が確認されたのに対し、GST-p300 (576aa~672aa) では結合が見られなかった。また、GST-p300 (567aa~652aa) においても PRS1 との結合が見られたが、GST-p300 (567aa~639aa) では結合が見られなかった。以上の結果より、*in vitro* において、PRS1 との結合には p300 の 567aa~652aa が重要であることが示された。

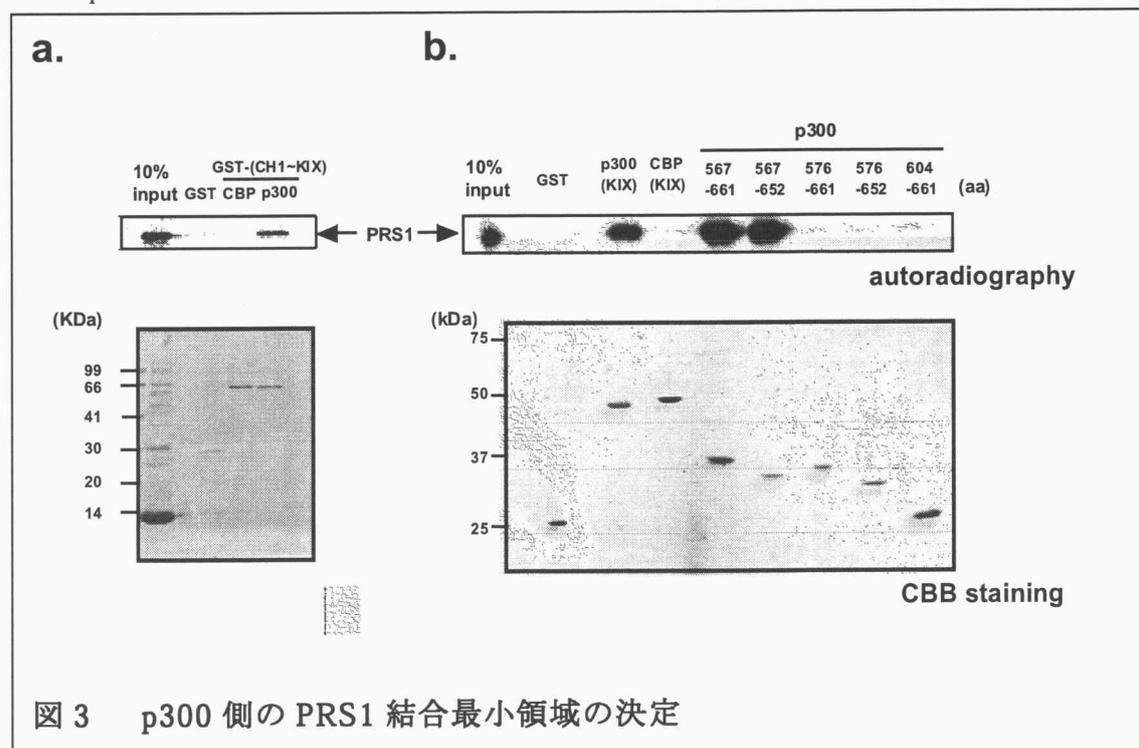


図3 p300 側の PRS1 結合最小領域の決定

2. PRS1 分子内の p300(KIX)結合責任領域の決定

PRS1 の様々な欠失変異体を作製したが、タンパク質の発現の低下、可溶性の低下のため、実験の進行が困難であった。そこで、p300 (KIX)領域とは相互作用しない PRS2 とのキメラタンパク質を作製し、PRS1 側の p300 (KIX)結合責任領域の決定をおこなった。PRS1 と PRS2 は、ともに 318 アミノ酸残基から構成され、アミノ酸レベルにおける相同性は、95% である。ウサギ網状赤血球の抽出液を用いて、放射性同位体 [³⁵S]-Methionine 存在下、*in vitro* 合成した PRS1 キメラタンパク質と等量 GST 及び GST-p300 (KIX) 領域をインキュベートした結果、PRS1 の 170 番目のアミノ酸から 190 番目のアミノ酸領域を含むキメラ PRS が p300 (KIX) 領域との結合に重要であることが示唆された [図 4]。

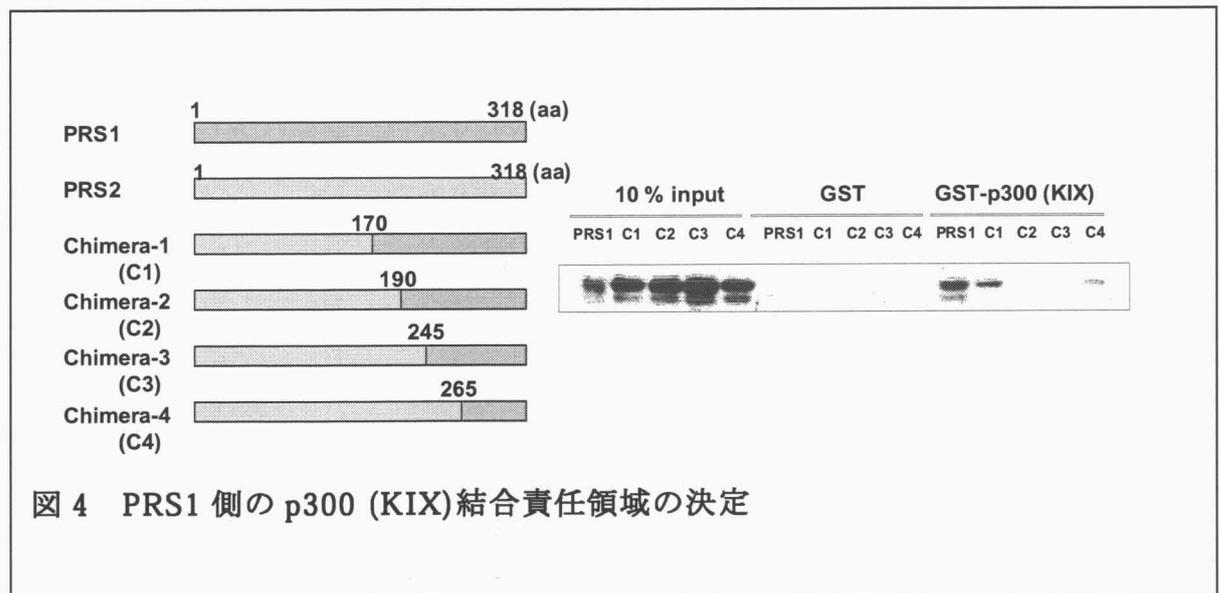


図 4 PRS1 側の p300 (KIX)結合責任領域の決定

3. Mammalian Two Hybrid System を用いた PRS1 と全長 p300 との結合検討

PRS1 と全長 p300 との結合を検討するため Gal4 DNA 結合領域と融合させた PRS1 発現プラスミドである pM-PRS1、VP16 融合タンパク質発現プラスミドである pVP16-PRS1、pVP16-CBP、pVP16-p300 をそれぞれ構築した。MCF7 細胞 (5×10^3 個/ well, 24-well plate, Nalge Nunc International) にベイトとプレイに相当するプラスミドを共にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイをおこなった。その結果、PRS1 は、全長の p300 と特異的な結合を示すことが示唆された [図 5]。

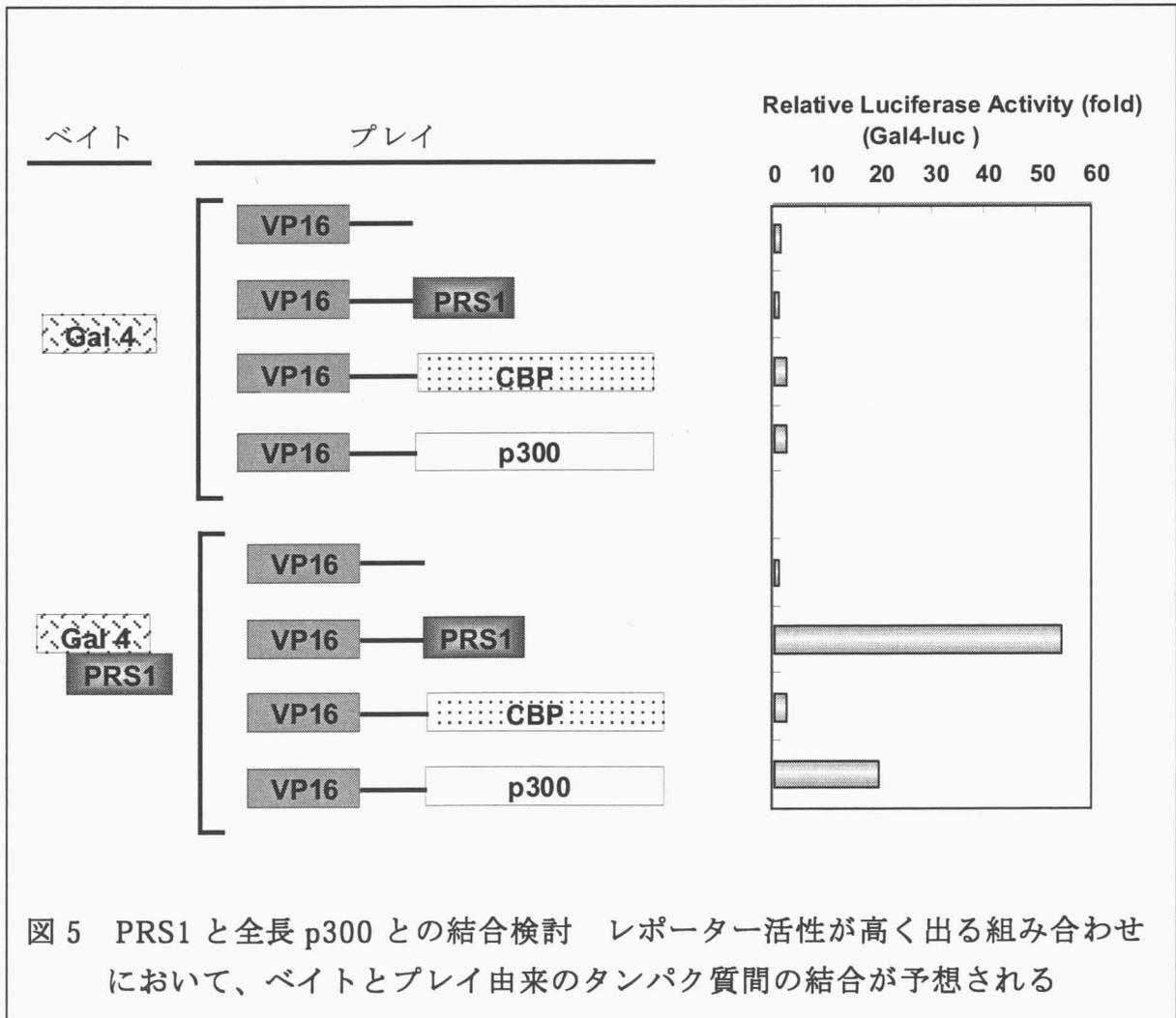


図 5 PRS1 と全長 p300 との結合検討 レポーター活性が高く出る組み合わせにおいて、ベイトとプレイ由来のタンパク質間の結合が予想される

考察

今回、著者は、CBP、p300 の Tax 結合領域である KIX 領域において、p300 特異的に相互作用する因子、PRS1 を同定した。CBP や p300 の KIX 領域には、CREB や c-Jun, c-Myb など多くの転写因子が結合することが知られているが、p300 の KIX 領域のみ特異的に結合する因子の報告は未だない(30-38)。PRS1 は、プリンヌクレオチドの生合成の出発物質である 5-ホスホリボシル-1-ピロリン酸 (PRPP) を合成する PRPP 合成酵素の触媒サブユニットの 1 つである。リボース-5-リン酸に ATP のピロリン酸基を転位することにより PRPP を合成する。このタンパク質は、種間でもアミノ酸配列が高度に保存されている(39-43)。生体内では、PRS1, PRS2 などいくつかの因子と複合体を形成し、分子量約 1000kDa として存在することが報告されている。一方、p300 も DNA 合成に関与することが報告されている。p300 のノックアウトマウスの解析より、p300 が細胞の正常な増殖に必要であり、p300 の欠損したマウス胎児細胞では DNA 合成が著しく減少することが報告された(44)。なお、p300 が DNA 修復酵素である PCNA や DNA ポリメラーゼ β と結合し、DNA の修復に関与する可能性があること、CBP、p300 とも Thymine DNA Glycosylase をアセチル化し、その塩基除去修復活性を上昇させることなど DNA 合成、修復についての報告も多い(45-47)。CBP と p300 は多くの類似機能を示すが、最近、CBP と p300 の機能の明らかな違いが報告されている。マウス F9 細胞において、CBP 及び p300 に特異的なリボザイムを用いてそれぞれを特異的にノックダウンさせた結果、レチノイン酸による分化誘導において p300 が必須であり、CBP は関与していないことが判明した(48)。このことから、転写因子によっては、会合する転写コアクチベーターが異なり、CBP と p300 に関しても、使い分けが行われている可能性が示唆された。一方、マウスを用いて CBP と p300 の機能の使い分けを証明した報告もある。CBP および p300 の KIX ドメインにおいて CREB, c-Myb との結合に重要なアミノ酸の点変異トランスジェニックマウスを作製し、その解析をおこなった結果、p300 のホモ変異型では、造血系異常が表れるが、対応する CBP の点変異トランスジェニックマウスでは、変化は見られなかった(49)。以上の結果より、CBP、p300 の機能がマウス生体内において重複していないこと、転写因子も CBP、p300 を使い分けていることが考えられた。PRS1 は、p300 特異

的に結合する性質をもつため、CBP と p300 の機能の使い分けを示す可能性が考えられる。PRS1 の細胞内局在は、細胞周期に伴う動態は明らかでないが、主に細胞質に局在している (data not shown)。一方、p300 は、主に核内に局在するが、細胞質と核内を移動することが知られている。MEKK1 刺激下では、p300 は、一部、細胞質へと移行し、MEKK1 と共局在を示す(50)。p300 が MEKK1 によりリン酸化を受け、局在の変化をもたらす可能性もあるが、明らかではない。増殖刺激条件下において、核酸の生合成が活性化される際、MEKK1 を介したシグナルによって、p300 と PRS1 が会合し、p300 が核酸生合成に影響を与えている可能性が考えられる。

一方、臨床面において、ヒト CBP の変異は、顔面奇形や精神遅滞を伴う優性遺伝病 Rubinstein-Taybi 症候群を引き起こすことが知られている(51)。また、p300 については、胃癌、結腸癌など消化器系の腫瘍に変異の報告がある(52)。その他、急性骨髄性白血病の患者において染色体転座によって生じた MOZ-CBP、MOZ-p300、MLL-CBP あるいは MLL-p300 の融合タンパク質が発現していることが報告されている(53-59)。マウスの骨髄に MLL-CBP 融合遺伝子をレトロウイルスを用いて導入した結果、骨髄性白血病を発症したことから、CBP、p300 の機能修飾が骨髄性白血病に関与する可能性が示唆された(60)。Tax は、CBP や p300 と会合することで CBP/p300 を介した転写を修飾するが、CBP、p300 そのものの機能阻害が p53 などの機能抑制と相乗効果を示し、T 細胞をがん化に導く可能性も考えられる。PRS1 については、核酸合成経路の触媒活性以外に転写、複製などにおよぼす効果は知られていないが、今後、p300 との結合を通して、その意義を解析することは重要である。また、PRS1 の機能解析を通して、CBP と p300 の機能を明らかにできると考えられる。一方、Tax と PRS1 が p300 との結合を拮抗するのか、もし拮抗するのであれば、Tax の機能にどのような効果を及ぼすのか、あるいは逆に PRS1 の機能におよぼす効果は何かなど今後の解明が期待される。

総括および結論

本研究において、著者は、転写制御機構の観点より、HTLV-1 Tax ががん抑制遺伝子 p53 と相同性の高い p73, p51 の転写活性化能に与える影響について検討した。また、転写コアクチベーターCBP/p300 の Tax 結合領域に相互作用する因子の探索を行い、以下の新知見を得た。

1. HTLV-1 感染細胞株である MT-2 細胞においては、p73 α 、p73 β 、p51A の転写活性化能が抑制された。
2. Tax は、p73 α 、p73 β 、p51A の転写活性化能を抑制した。
3. Tax は、p53 ファミリータンパク質の転写活性化領域を介して転写活性化能を抑制した。
4. 転写コアクチベーター CBP/p300 に結合できない Tax 変異体 (K88A) は、p53 ファミリータンパク質の転写活性化能を抑制できなかったことから、Tax と CBP/p300 の相互作用が p53 ファミリータンパク質の転写活性化能抑制に重要であることが示唆された。
5. p300 の Tax 結合領域に特異的に結合する因子、PRS1 を新規に同定し、両タンパク質の結合責任領域を決定した。

本研究の成果により、Tax によって引き起こされる細胞内での転写因子の抑制には、転写コアクチベーターと Tax の相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、Tax により p73、p51 の機能抑制がみられたことから、これらの機能阻害が Tax による細胞がん化に関与している可能性も考えられる。また、p300 の Tax 結合領域特異的に相互作用する PRS1 を同定したことで、今後、Tax が核酸合成に及ぼす影響などの新たな機能が明らかになる可能性もある。さらに、PRS1 は、CBP には結合せず、p300 特異的に結合することが示されたので、核酸代謝への p300 の関与が推定される。

謝辞

本研究に際しまして、終始、懇切な御指導と御鞭撻を賜りました、京都大学ウイルス研究所 下遠野邦忠 教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接ご指導を賜り、多くの有益なご助言を頂きました京都大学ウイルス研究所 有海康雄 助手に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益なご助言を頂きました京都大学ウイルス研究所 土方誠 助教授に深く感謝致します。また、本研究に直接ご協力頂きました馬場景子 学士、様々なご助言を頂いた渡士幸一 修士、さらに本研究を支えて頂いた京都大学ウイルス研究所ヒトがんウイルス研究分野の皆さまに心より感謝致します。

発表論文

本研究の内容の大部分は以下の論文に公表した。

- (1) Kaida A, Ariumi Y, Ueda Y, Lin JY, Hijikata M, Ikawa S, Shimotohno K.
Functional impairment of p73 and p51, the p53-related proteins, by the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein.
Oncogene (2000), 19, 827-830.

- (2) Ariumi Y, Kaida A, Lin JY, Hirota M, Masui O, Yamaoka S, Taya Y, Shimotohno K.
HTLV-1 Tax oncoprotein represses the p53-mediated *trans*-activation function through coactivator CBP sequestration.
Oncogene(2000), 19, 1491-1499.

- (3) Ariumi Y, Kaida A, Hatanaka M, Shimotohno K.
Functional coss-talk of HIV-1 Tat with p53 through its C-terminal mdoain.
Biochem Biophys Res Commun. (2001), 287, 556-61.

引用文献

1. Cereseto, A., Diella, F., Mulloy, J. C., Cara, A., Michieli, P., Grassmann, R., Franchini, G., and Klotman, M. E. (1996) *Blood* **88**, 1551-1560
2. Akagi, T., Ono, H., Tsuchida, N., and Shimotohno, K. (1997) *FEBS Lett* **406**, 263-266
3. Ariumi, Y., Kaida, A., Lin, J. Y., Hirota, M., Masui, O., Yamaoka, S., Taya, Y., and Shimotohno, K. (2000) *Oncogene* **19**, 1491-1499
4. Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J. C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J. M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F., and Caput, D. (1997) *Cell* **90**, 809-819
5. Osada, M., Ohba, M., Kawahara, C., Ishioka, C., Kanamaru, R., Katoh, I., Ikawa, Y., Nimura, Y., Nakagawara, A., Obinata, M., and Ikawa, S. (1998) *Nat Med* **4**, 839-843
6. Ueda, Y., Hijikata, M., Takagi, S., Chiba, T., and Shimotohno, K. (1999) *Oncogene* **18**, 4993-4998
7. Kiyono, T., Hiraiwa, A., Ishii, S., Takahashi, T., and Ishibashi, M. (1994) *J Virol* **68**, 4656-4661
8. Akagi, T., Ono, H., Nyunoya, H., and Shimotohno, K. (1997) *Oncogene* **14**, 2071-2078
9. Yamaoka, S., Inoue, H., Sakurai, M., Sugiyama, T., Hazama, M., Yamada, T., and Hatanaka, M. (1996) *Embo J* **15**, 873-887
10. Harrod, R., Tang, Y., Nicot, C., Lu, H. S., Vassilev, A., Nakatani, Y., and Giam, C. Z. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 5052-5061
11. Bargonetti, J., Reynisdottir, I., Friedman, P. N., and Prives, C. (1992) *Genes Dev* **6**, 1886-1898
12. Dobner, T., Horikoshi, N., Rubenwolf, S., and Shenk, T. (1996) *Science* **272**, 1470-1473
13. Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990) *Cell* **63**, 1129-1136
14. Segawa, K., Minowa, A., Sugasawa, K., Takano, T., and Hanaoka, F. (1993) *Oncogene* **8**, 543-548

15. Werness, B. A., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990) *Science* **248**, 76-79
16. Yew, P. R., and Berk, A. J. (1992) *Nature* **357**, 82-85
17. Yew, P. R., Liu, X., and Berk, A. J. (1994) *Genes Dev* **8**, 190-202
18. Higashino, F., Pipas, J. M., and Shenk, T. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15683-15687
19. Marin, M. C., Jost, C. A., Irwin, M. S., DeCaprio, J. A., Caput, D., and Kaelin, W. G., Jr. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 6316-6324
20. Roth, J., Konig, C., Wienzek, S., Weigel, S., Ristea, S., and Dobbelstein, M. (1998) *J Virol* **72**, 8510-8516
21. Steegenga, W. T., Shvarts, A., Riteco, N., Bos, J. L., and Jochemsen, A. G. (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 3885-3894
22. Chang, J., Kim, D. H., Lee, S. W., Choi, K. Y., and Sung, Y. C. (1995) *J Biol Chem* **270**, 25014-25019
23. Venot, C., Maratrat, M., Sierra, V., Conseiller, E., and Debussche, L. (1999) *Oncogene* **18**, 2405-2410
24. Mulloy, J. C., Kislyakova, T., Cereseto, A., Casareto, L., LoMonico, A., Fullen, J., Lorenzi, M. V., Cara, A., Nicot, C., Giam, C., and Franchini, G. (1998) *J Virol* **72**, 8852-8860
25. Rosin, O., Koch, C., Schmitt, I., Semmes, O. J., Jeang, K. T., and Grassmann, R. (1998) *J Biol Chem* **273**, 6698-6703
26. Matsumoto, K., Shibata, H., Fujisawa, J. I., Inoue, H., Hakura, A., Tsukahara, T., and Fujii, M. (1997) *J Virol* **71**, 4445-4451
27. Kao, S. Y., and Marriott, S. J. (1999) *J Virol* **73**, 4299-4304
28. Miyake, H., Suzuki, T., Hirai, H., and Yoshida, M. (1999) *Virology* **253**, 155-161
29. Arany, Z., Sellers, W. R., Livingston, D. M., and Eckner, R. (1994) *Cell* **77**, 799-800
30. Chrivia, J. C., Kwok, R. P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M. R., and Goodman, R. H. (1993) *Nature* **365**, 855-859
31. Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Hou, D. X., Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Takahashi, T., and Ishii, S. (1996) *Genes Dev* **10**, 528-540
32. Giebler, H. A., Loring, J. E., van Orden, K., Colgin, M. A., Garrus, J. E., Escudero, K. W., Brauweiler, A., and Nyborg, J. K. (1997) *Mol Cell Biol* **17**, 5156-5164

33. Bannister, A. J., Oehler, T., Wilhelm, D., Angel, P., and Kouzarides, T. (1995) *Oncogene* **11**, 2509-2514
34. Arias, J., Alberts, A. S., Brindle, P., Claret, F. X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J., and Montminy, M. (1994) *Nature* **370**, 226-229
35. Kwok, R. P., Lundblad, J. R., Chrivia, J. C., Richards, J. P., Bachinger, H. P., Brennan, R. G., Roberts, S. G., Green, M. R., and Goodman, R. H. (1994) *Nature* **370**, 223-226
36. Kwok, R. P., Lurance, M. E., Lundblad, J. R., Goldman, P. S., Shih, H., Connor, L. M., Marriott, S. J., and Goodman, R. H. (1996) *Nature* **380**, 642-646
37. Oelgeschlager, M., Janknecht, R., Krieg, J., Schreek, S., and Luscher, B. (1996) *Embo J* **15**, 2771-2780
38. Parker, D., Ferreri, K., Nakajima, T., LaMorte, V. J., Evans, R., Koerber, S. C., Hoeger, C., and Montminy, M. R. (1996) *Mol Cell Biol* **16**, 694-703
39. Becker, M. A., Heidler, S. A., Bell, G. I., Seino, S., Le Beau, M. M., Westbrook, C. A., Neuman, W., Shapiro, L. J., Mohandas, T. K., Roessler, B. J., and et al. (1990) *Genomics* **8**, 555-561
40. Bower, S. G., Hove-Jensen, B., and Switzer, R. L. (1988) *J Bacteriol* **170**, 3243-3248
41. Ishijima, S., Taira, M., and Tatibana, M. (1989) *Nucleic Acids Res* **17**, 8860
42. Ishijima, S., Taira, M., and Tatibana, M. (1989) *Nucleic Acids Res* **17**, 8859
43. Roessler, B. J., Bell, G., Heidler, S., Seino, S., Becker, M., and Palella, T. D. (1990) *Nucleic Acids Res* **18**, 193
44. Yao, T. P., Oh, S. P., Fuchs, M., Zhou, N. D., Ch'ng, L. E., Newsome, D., Bronson, R. T., Li, E., Livingston, D. M., and Eckner, R. (1998) *Cell* **93**, 361-372
45. Hasan, S., Hassa, P. O., Imhof, R., and Hottiger, M. O. (2001) *Nature* **410**, 387-391
46. Hasan, S., El-Andaloussi, N., Hardeland, U., Hassa, P. O., Burki, C., Imhof, R., Schar, P., and Hottiger, M. O. (2002) *Mol Cell* **10**, 1213-1222
47. Tini, M., Benecke, A., Um, S. J., Torchia, J., Evans, R. M., and Chambon, P. (2002) *Mol Cell* **9**, 265-277
48. Kawasaki, H., Eckner, R., Yao, T. P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D. M., and Yokoyama, K. K. (1998) *Nature* **393**, 284-289

49. Kasper, L. H., Boussouar, F., Ney, P. A., Jackson, C. W., Rehg, J., van Deursen, J. M., and Brindle, P. K. (2002) *Nature* **419**, 738-743
50. See, R. H., Calvo, D., Shi, Y., Kawa, H., Luke, M. P., and Yuan, Z. (2001) *J Biol Chem* **276**, 16310-16317
51. Petrij, F., Giles, R. H., Dauwerse, H. G., Saris, J. J., Hennekam, R. C., Masuno, M., Tommerup, N., van Ommen, G. J., Goodman, R. H., Peters, D. J., and et al. (1995) *Nature* **376**, 348-351
52. Muraoka, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Shitara, N., Chong, J. M., Iwama, T., and Miyaki, M. (1996) *Oncogene* **12**, 1565-1569
53. Borrow, J., Stanton, V. P., Jr., Andresen, J. M., Becher, R., Behm, F. G., Chaganti, R. S., Civin, C. I., Distech, C., Dube, I., Frischauf, A. M., Horsman, D., Mitelman, F., Volinia, S., Watmore, A. E., and Housman, D. E. (1996) *Nat Genet* **14**, 33-41
54. Giles, R. H., Peters, D. J., and Breuning, M. H. (1998) *Trends Genet* **14**, 178-183
55. Ida, K., Kitabayashi, I., Taki, T., Taniwaki, M., Noro, K., Yamamoto, M., Ohki, M., and Hayashi, Y. (1997) *Blood* **90**, 4699-4704
56. Kitabayashi, I., Aikawa, Y., Yokoyama, A., Hosoda, F., Nagai, M., Kakazu, N., Abe, T., and Ohki, M. (2001) *Leukemia* **15**, 89-94
57. Rowley, J. D., Reshmi, S., Sobulo, O., Musvee, T., Anastasi, J., Raimondi, S., Schneider, N. R., Barredo, J. C., Cantu, E. S., Schlegelberger, B., Behm, F., Doggett, N. A., Borrow, J., and Zeleznik-Le, N. (1997) *Blood* **90**, 535-541
58. Sobulo, O. M., Borrow, J., Tomek, R., Reshmi, S., Harden, A., Schlegelberger, B., Housman, D., Doggett, N. A., Rowley, J. D., and Zeleznik-Le, N. J. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8732-8737
59. Taki, T., Sako, M., Tsuchida, M., and Hayashi, Y. (1997) *Blood* **89**, 3945-3950
60. Lavau, C., Du, C., Thirman, M., and Zeleznik-Le, N. (2000) *Embo J* **19**, 4655-4664