

## CD1d와 상호작용하는 단백질의 동정

황광우\* · 전태훈#

\*중앙대학교 약학대학, 한양대학교 의과대학  
(Received July 19, 2006; Revised August 21, 2006)

### The Identification of Proteins Interacting with CD1d

KwangWoo Hwang\* and Taehoon Chun#

\*College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea  
College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

**Abstract** — CD1d is an unique antigen presenting molecule which provides antigenic repertoires to NKT cells. To examine molecules required for CD1d antigen presentation, we determined an interaction between CD1d and several endoplasmic reticulum (ER) resident molecular chaperones by co-immunoprecipitation. Results indicated that calnexin and calreticulin seem to be bound to mouse CD1d, but TAP and tapasin do not bind. Further, we screened a yeast two hybrid system to identify proteins that help mouse CD1d transportation in the cytosol. We found that two proteins, heat shock protein  $\alpha$  subunit (Hsp90 $\alpha$ ) and protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3 (PACSIN-3), interact with CD1d. Future study will be focus on the role of these molecules during the CD1d antigen presentation.

**Keywords** □ antigen presenting molecule, CD1d, immunoprecipitation, molecular chaperone, yeast two hybrid screening

주요 조직 적합성 항원(MHC; major histocompatibility complex) class Ib는 기존의 MHC class Ia와 구조적으로 유사하여 항원전달물질로 여겨지나, 항원 인식 부위(antigen binding motif)의 특이성에 의해 기존의 MHC class Ia와 같이 9개의 아미노산으로 구성된 nonameric peptide를 인식하는 것이 아니라, 각각의 독특한 항원을 인식한다. 특히 포유동물의 CD1 family는 당지질(glycolipid)이나 지질(lipid)로 구성된 항원을 선택적으로 인식하는 것이 입증되었다.<sup>1)</sup>

CD1 family는 크게 "classical CD1"과 CD1d로 구분된다. "classical CD1"은 다시 CD1a, CD1b, CD1c로 나뉘는데, 이것들은 주로 주요항원인식세포(professional antigen presenting cell)인 B 림프구, 대식세포(macrophage), 수지상세포(dendritic cell)에서 발현한다.<sup>2)</sup> 그러나 "classical CD1"에 반응하는 T 림프구의 성질이나 존재에 대해서는 아직 알려진바 없으며, 포유동물 각에 반응하는 주 종(species)에 따라 "classical CD1"을 구성하는 유전자의 수가 틀리다. CD1d 또한 주로 주요항원인식세포에서

발현하고 있으며, CD1d에 반응하는 T 림프구로서는 NK1.1+T (NKT) 림프구가 알려져 있고, 모든 포유동물 중에 잘 보존되어 있다.<sup>3)</sup>

NKT 림프구는 NK 세포 receptor와 T 림프구 receptor  $\alpha\beta$ , 그리고 활성화된 T 림프구 표면항원을 가지고 있는 독특한 세포이다. NKT 림프구는 모든 장기에서 찾아볼 수 있지만, 기존의 T 림프구에 비해 상대적으로 적은 양(1~2%)으로 존재한다.<sup>4)</sup> 그러나, 간장(liver)과 골수(bone marrow)에 존재하는 T 림프구의 상당 양(10~30%)을 차지하고 있다.<sup>4)</sup> NKT 림프구는 크게 CD1d를 인식하는 것과 CD1d를 인식하지 않는 것으로 분류된다.<sup>5)</sup> CD1d를 인식하는 NKT 림프구의 대부분은 co-receptor로 CD4<sup>+</sup> 혹은 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>(DN)을 가지고 있고, CD1과 당지질(glycolipid) 항원을 인식하여 IFN- $\gamma$ 와 IL-4를 다량 방출 할 수 있다.<sup>5)</sup> 또한, 이들 림프구는 매우 제한된 T 세포 receptor  $\alpha\beta$ 를 가지며(생쥐의 경우 V $\alpha$ 14, J $\alpha$ 281과 V $\beta$ 2, V $\beta$ 7, V $\beta$ 8), 주로 흉선이나 간장 내 T 림프구(hepatic T lymphocyte)의 상당부분을 차지하고 있다.<sup>5,6)</sup> CD1d를 인식하지 않는 NKT 림프구는 co-receptor로 CD8<sup>+</sup> 혹은 DN을 가지고 있고, 당지질 항원과 CD1을 인식하지 못한다.<sup>7)</sup> 이들 림프구는 CD1d를 인식하는 NKT 세포와는 달리 다양한 V $\alpha$ 와 V $\beta$ 로 구성된 T 세포 receptor  $\alpha\beta$ 를 가지며, 주로

\*본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-3290-0369 (팩스) 02-3290-3507  
(E-mail) tchun34@hanyang.ac.kr

비장이나 골수에서 발견되지만 아직 생물학적 중요성에 대해서는 연구된 바 없다.<sup>7)</sup>

CD1d에 반응하는 NKT 림프구는 생체 내에서 적은 양으로 존재하고 있지만, 항원의 자극에 의해 다량의 IFN- $\gamma$ 와 IL-4를 방출 할 수 있기 때문에 B 림프구, NK 세포, 혹은 기존의 T 림프구의 활성을 조절 할 수 있다. 따라서 NKT 세포는 흔히 면역반응의 조절자(immune-modulator)라 불리 우며, 실제로 이들 세포를 이용한 암치료(cancer therapy), 자가면역질환(autoimmune disease) 치료 방법이 다각적으로 연구되고 있다.<sup>8,9)</sup>

NKT 림프구를 이용한 면역 치료 방법의 필수 조건은 CD1d의 항원인식 방법에 대한 자세한 이해이며, 이러한 이해는 효율적인 NKT 림프구의 활성화에 큰 도움이 된다. 하지만 지금까지 진행된 CD1d에 관련된 연구는 CD1d 항원인식 기전에 대한 전체적인 이해 없이, 주로 CD1d를 인식하는 NKT 세포의 생물학적, 또는 기능적 연구에 국한 되어있다. 특히 CD1d의 항원인식과정에서 CD1d가 어떤 기전으로 endoplasmic reticulum(ER)에서 세포막으로 움직이고, 어떠한 molecular chaperone이 CD1d와 반응하는지에 대한 구체적인 증거나 물질들을 제시하지 못하였다. 따라서 본 연구는 CD1d의 항원인식과정에 기존의 어떠한 molecular chaperone들이 요구되며, 또한 CD1d 항원 인식 과정에 필요한 새로운 molecular chaperone의 발견 및 고찰을 목적으로 한다.

## 실험 재료 및 방법

### 실험재료

항 생쥐 MHC class Ia 항체, 항 생쥐 CD1d 항체, 각각의 isotype control은 BD Pharmingen(USA)에서 구입하였고, 항 calnexin, calreticulin 항체는 StressGen(Canada)에서 구입하였다. 항 TAP1 항체와 tapasin 항체는 Hansen 박사(Washington University, USA)와 Schoenhals 박사(R. W. Johnson Pharmaceutical Research Institute, USA)가 제공 하였다. 이외 언급하지 않은 모든 시약은 Sigma(USA)에서 구입하였다.

### 세포배양 및 CD1d 과발현 세포주 확립

생쥐 B 세포주인 A20는 ATCC(USA)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. A20 세포주는 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone, USA)을 함유한 DMEM(Invitrogen, USA) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 분압조건으로 배양하였다. CD1d 과발현 세포주는 A20 세포주에 생쥐 CD1d를 과발현시켜 CD1d 과발현 세포주(A20.CD1d)를 확립하였다. 이것은 pCDNA(invitrogen, USA) expression vector에 full length 생쥐 CD1d cDNA를 cloning하고 lipofectamine(invitrogen, USA)을 이용하여 A20 세포주에 transfection하여 유전자 도입 세포를 G418(1 mg/ml)에서 선별하여 확립하였다. Full length 생쥐 CD1d cDNA는 생쥐 비장 세포

의 total RNA를 분리하여, RT-PCR에 의해 제작하였다. 만들어진 생쥐 CD1d cDNA는 1048 bp로 이 것을 검증하기 위해 pGEM TA vector(Promega, USA)에 cloning 한 후, 자동서열 분석기(ABI, USA)로 DNA 염기서열을 결정하였다. 그 결과 기존의 생쥐 CD1d cDNA와 100% homology(GenBank access no. NM\_007639)를 보였다. RT-PCR의 primer는 다음과 같다. Forward primer: TAGAACTCTGGCGCTATGCGGT; Reverse primer: GAGAGGCAGGTGTAAGGAAGAGTCA.

### Co-immunoprecipitation

확립된 CD1d 과발현 세포주(A20.CD1d)를 lysis buffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% CHAPS)로 단백질을 추출하여 항 생쥐 MHC class Ia 항체와 항 CD1d 항체가 함유된 protein A agarose로 각각 immunoprecipitation 시킨 후, 추출한 단백질을 10% SDS PAGE gel에서 분리하였다. PVDF membrane에 transfer 한 후, 각 단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 이용하여 Western blot을 수행하였다.

### Yeast two hybrid screening

Yeast two hybrid system에 사용되는 bait를 만들기 위해 full length 생쥐 CD1d cDNA를 추출한 후, *EcoRI*과 *SalI*의 제한효소 부위를 이용하여 pGilda vector에 cloning하였다. 이 plasmid를 yeast EGY48[*MATa*, *his3*, *trp1*, *ura3-52*, *leu2::pLeu2-LexAop 6/pSH18-34(LexAop-lacZ reporter)*] 세포주에 lithium acetate 방법에 의해 transformation하였고, 이 transformant를 yeast synthetic 배지(Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>)에서 배양하였다. 그 후, 이 배지에서 자란 yeast 균주를 선택하여 생쥐 비장 cDNA library의 transformation의 host로 사용하여 CD1d와 결합하는 단백질들의 cDNA를 선별하였다. 선택된 cDNA는 B42 융합 단백질을 만들기 위해, cDNA 단편을 *EcoRI*과 *XhoI*의 제한효소 부위를 이용하여 pJG4-5 vector에 cloning하였고, 이러한 융합 단백질은 galactose에 의해 발현되도록 조절되었다. 이 후, 만들어진 B42 융합 단백질 cDNA construct는 yeast competent 세포에 transformation되고, Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup> 배지에서 tryptophan prototrophy에 의해 선별되었다. Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup> 배지에서 자란 colony 중  $\beta$ -galactosidase assay를 통하여 false positive를 제거하고, 최종 positive clone에서 cDNA를 분리, 정제하여 자동서열 분석기(ABI, USA)로 DNA 염기서열을 결정하였다.

### Flow cytometry 분석

생쥐 B 세포주인 A20와 A20.CD1d( $1 \times 10^6$  cells)를 flow cytometry로 분석하기 위해 PBS로 3번 세척하였다. 그 후, 세포를 2% fetal bovine serum을 함유한 PBS 50  $\mu$ l에 현탁 한 후, 4°C에서 항 생쥐 MHC class Ia 항체와 CD1d 항체와 30분간

방치하였다. 이 후 세포와 항체가 들어있는 반응액을 PBS로 3번 세척하였다. Flow cytometry 분석은 FACSCalibur(BD Pharmingen, USA)를 이용하였고 PBS 400  $\mu$ 에 세포를 현탁하여 MHC class Ia와 CD1d의 세포 표면 발현을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

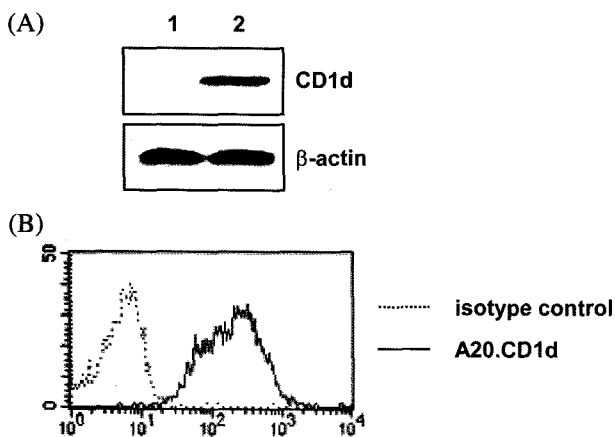
### CD1d 과발현 세포주 확립

CD1d의 항원인식 과정은 MHC class I과 class II의 항원인식 과정의 혼합형으로 생각되어진다. 즉 MHC class I과 같이 ER에서 생성되지만, class II와 같이 항원을 인식하기 위해 MHC class II compartment(MIIC) 또는 endosomal compartment로 이동하게 된다.<sup>10)</sup> 이때 중요한 역할을 하는 것이 CD1b와 CD1d cytoplasmic tail에 존재하는 YXX $\emptyset$ (Y는 tyrosine, X는 모든 아미노산, 그리고  $\emptyset$ 는 hydrophobic motif를 가진 아미노산)로서 이 motif는 CD1d가 ER에서 MIIC로 이동할 때 중요한 역할을 한다.<sup>11)</sup> 따라서 이 motif가 없으면 CD1d가 세포표면으로 항원을 전달하지 못하며, 이에 따라 NKT 세포의 활성도 저해된다.<sup>11)</sup> 본 연구는 이러한 고유의 CD1d 항원인식기전을 연구하기 위해 우선 CD1d 과발현 세포주를 확립하였다. CD1d 과발현 세포주에 사용된 promoter는 H2-K<sup>b</sup>(생쥐 MHC class I)를 사용하였고, bovine poly A tail과 promoter 사이에 full length 생쥐 CD1d cDNA를 cloning하였다. 그 후, 생쥐 B 림프구인 A20 세포주에 transfection하여 유전자 도입 세포를 G418(1 mg/ml)에서 선별하

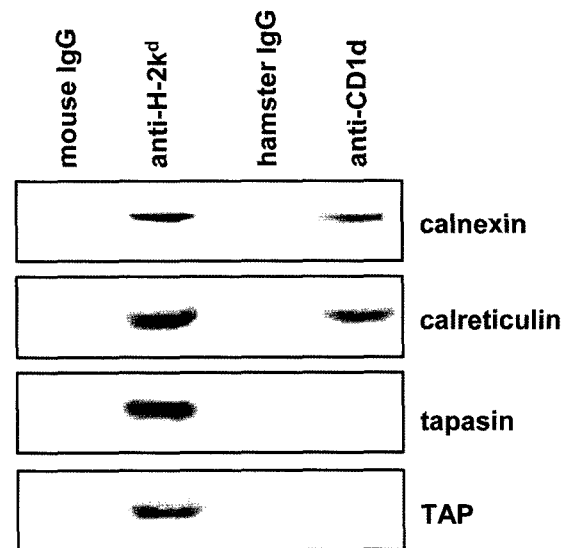
여 확립하였다. 확립된 CD1d 과발현 A20 세포주(A20.CD1d)에서 생쥐 CD1d의 과발현을 검증하기 위해 Western blot 분석(Fig. 1A)과 CD1d의 세포 표면 발현을 flow cytometry로 측정하였다(Fig. 1B). 그 결과 A20.CD1d 세포주에서 CD1d의 세포표면 발현이 매우 향상 되는 것이 측정되었다.

### CD1d와 calnexin, calreticulin과의 결합 확인

CD1의 항원인식 과정은 MHC class I과 class II의 항원인식 과정의 혼합형으로 생각되어지나, 지금까지 알려진 MHC class I에 대한 주요 ER-molecular chaperone과의 상호 작용에 대한 연구는 아직 체계적으로 이루어지지 않고 있다. MHC class I 항원 인식 과정에 사용되는 주요 ER-molecular chaperone은 calnexin, calreticulin, tapasin, TAP 등이 있으며, 이들 molecular chaperone은 MHC class I 항원 인식에 매우 중요한 역할을 한다.<sup>12)</sup> 즉 TAP과 tapasin은 세포질에서 과생된 항원을 ER에 있는 MHC class I에 전달해 주는데 중요한 역할을 하며, calnexin과 calreticulin은 ER에서 MHC class I의 구조적 안정성을 결정하는데 중요한 역할을 한다.<sup>12)</sup> 따라서, 확립된 A20.CD1d에 생쥐 CD1d 항체를 이용한 co-immunoprecipitation을 통하여 어떠한 molecular chaperone이 CD1d와 결합하는지를 알아보았다. 우선 A20CD1 세포주를 약한 detergent인 0.5% CHAPS에서 lysis 시킨 후, 항 생쥐 CD1d에 의해 CD1d에 결합하는 단백

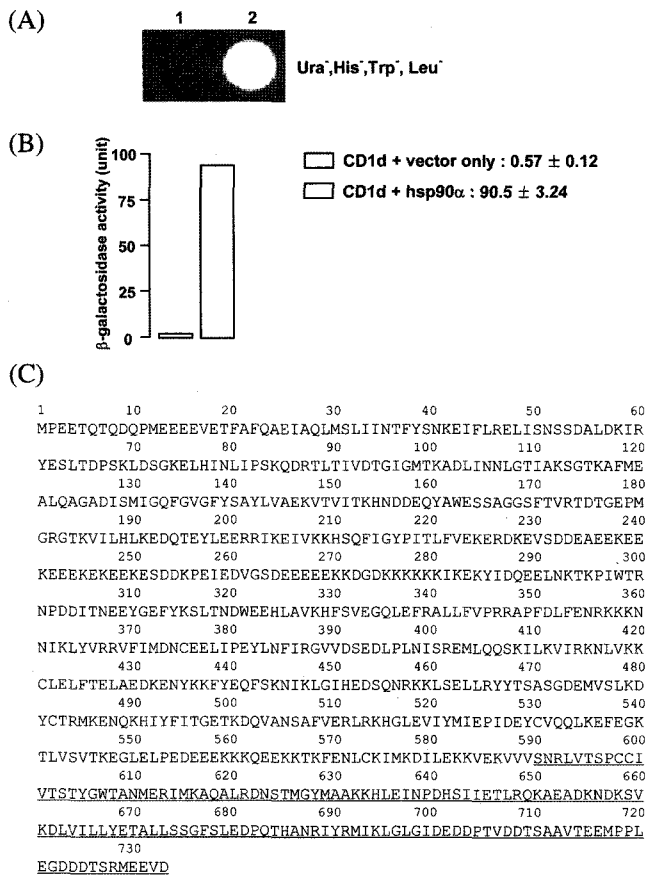


**Fig. 1** – Establishment of mouse CD1d overexpressing A20 cells. (A) Western blot analysis of mouse CD1d in mouse CD1d overexpressing A20 cells. Lanes 1; mock transfectant containing empty vector, 2; mouse CD1d transfectant (A20.CD1d). Cell lysates from both samples were contained the equivalent proteins when we immunoblotted using anti- $\beta$ -actin antibody (lower panel). (B) Flow cytometry analysis of A20.CD1d cells. The expression of mouse CD1d on mock transfectant is similar to the "dotted line" (data not shown). These data are representative of three independent experiments.



**Fig. 2** – Association of mouse CD1d with calnexin and calreticulin, but not tapasin and TAP. A20.CD1d cells were lysed in lysis buffer containing 1% CHAPS and subjected to immunoprecipitation with the indicated antibodies. Precipitates were resolved on 10% SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes. The presence of calnexin, calreticulin, tapasin and TAP in the various precipitates was assessed by probing the blots with anti-calnexin, anti-calreticulin, anti-tapasin, or anti-TAP, respectively.

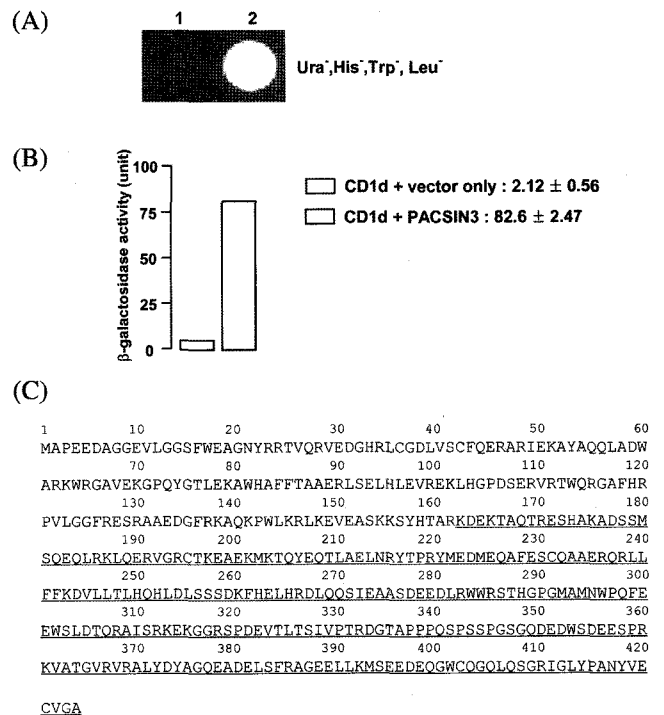
들을 침전 시킨 후, 각 각의 항 calnexin, calreticulin, tapasin, TAP 항체를 이용하여 Western blot을 시행하였다. 그 결과 MHC class I과는 달리 CD1d는 calnexin과 calreticulin과는 결합하지만, TAP과 tapasin과는 결합하지 않는 것이 관찰되었다(Fig. 2). 이러한 연구결과는 아마도 CD1d는 ER에서 생성되지만, 항원 인식은 MHC class II compartment(MIIC) 또는 endosomal compartment에서 일어나기 때문으로 생각되어진다. 또한 이러한 연구 결과는 TAP과 tapasin이 결핍된 생쥐에서 CD1d의 발현양이 저해 되지 않는다는 실험 보고와 일치한다(unpublished observation).



**Fig. 3** – Interaction analysis between mouse CD1d and hsp90 $\alpha$ . (A) The full length mouse CD1d cDNA and either plasmid containing a empty vector (lane 1) or a full length mouse hsp90 $\alpha$  cDNA (lane 2) were co-transformed into EGY48 yeast cells and selected in Ura, His, Trp and Leu deficient plates. (B) Binding activity of mouse CD1d and hsp90 $\alpha$  measured by o-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) assays.  $\beta$ -Galactosidase activity was measured by ONPG. The results are representative of three separate experiments. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (C) The amino acid sequence of mouse hsp90 $\alpha$  indicated using single letter abbreviations. The underlined amino acid sequence means the translated hsp90 $\alpha$  protein isolated from yeast two-hybrid screening.

**CD1d와 결합하는 두 단백질의 동정**

Yeast two hybrid system은 이미 기능을 알고 있는 단백질과 상호 작용하는 또 다른 단백질을 분리하는데 있어서 효과적인 실험방법 이라고 할 수 있다. 새로운 생쥐 CD1d 고유의 molecular chaperone을 찾기 위하여, yeast two hybrid system을 이용하였다. 우선 yeast two hybrid system에 사용되는 bait는 full length 생쥐 CD1d cDNA를 cloning하여 사용하였고, 이 plasmid를 yeast EGY48 세포주에 transformation하여 yeast synthetic 배지(Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>)에서 배양하였다. 그 후, 이 배지에서 자란 yeast 균주를 선택하여 생쥐 비장 cDNA library의 transformation의 host로 사용하여 CD1d와 결합하는 단백질들의 cDNA를 선별하였다. 그 결과 두 개의 cDNA가 선택되었으며, DNA 서열 결정 결과, 하나의 cDNA clone은 생쥐 heat shock protein  $\alpha$  subunit(Hsp90 $\alpha$ ) cDNA (GenBank access no. BC094024)와 100% homology를 보였으며(Fig. 3), 다른 하나의 clone은 생쥐



**Fig. 4** – Interaction analysis between mouse CD1d and PACSIN3. (A) The full length mouse CD1d cDNA and either plasmid containing a empty vector (lane 1) or a full length mouse PACSIN3 cDNA (lane 2) were co-transformed into EGY48 yeast cells and selected in Ura, His, Trp and Leu deficient plates. (B) Binding activity of mouse CD1d and PACSIN3 measured by ONPG assays.  $\beta$ -Galactosidase activity was measured by ONPG. The results are representative of three separate experiments. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (C) The amino acid sequence of mouse hsp90 $\alpha$  indicated using single letter abbreviations. The underlined amino acid sequence means the translated hsp90 $\alpha$  protein isolated from yeast two-hybrid screening.

protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3(PACSIN-3) cDNA(GenBank access no. BC003884)와 100% homology를 보였다(Fig. 4).

Hsp90은 Hsp90 $\alpha$ 와 Hsp90 $\beta$ 로 이루어진 대표적인 세포내 molecular chaperone으로서, 많은 단백질의 molecular chaperone으로 알려져 있으며, 최근에는 Hsp90을 이용한 세포 치료 방법의 개발이 모색되고 있다.<sup>13)</sup> PACSIN3는 2000년에 처음 알려진 단백질로서, neuron에서 처음 발견되었지만, 인산화 되는 부분을 가지고 있으며 구조적으로 보아 transferine receptor mediated vesicle endocytosis를 방해 할 것이라고 추측된다.<sup>14)</sup> 그러나 아직까지 그 기능은 명확히 알려져 있지 않으며, 특히 면역세포에서의 PACSIN-3 기능 연구는 아직까지 되어진바 없다. CD1d가 일종의 endocytic vesicle인 MHC class II compartment (MIIC) 또는 endosomal compartment에서 항원 인식을 하기 때문에, PACSIN3와 세포내 구역이 같고 따라서, PACSIN3와의 상호작용에 의해 CD1d의 항원 인식이 조절 될 수 있다고 생각되어진다. 따라서, 앞으로는 Hsp90 $\alpha$ 와 PACSIN3가 CD1d 발현에 미치는 영향에 대해 고찰하고자 한다.

### 결 론

본 연구에서는 항원자극시 IFN- $\gamma$ 와 IL-4를 다량으로 방출하여 생체 내에서 중요한 작용을 하는 NKT 세포에 항원을 전달해주는 항원전달 물질인 CD1d가 endoplasmic reticulum에 존재하고 있는 molecular chaperone인 calnexin과 calreticulin과 결합하는 것을 co-immunoprecipitation으로 확인 하였고, 또한 yeast two hybrid system을 이용하여 hsp90과 PACSIN-3가 CD1d와 상호작용하는 것을 확인 하였다. 앞으로는 hsp90과 PACSIN-3의 기능이 CD1d 항원인식 기전에 미치는 영향에 대해서 연구하고자 한다.

### 감사의 말씀

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의해서 연구되었음에 감사를 드립니다(KRF-2003-041-E00128).

### 문 헌

- 1) Beckman, E. M., Porcelli, S. A., Morita, C. T., Behar, S. M., Furlong, S. T. and Brenner, M. B. : Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted  $\alpha\beta$ +T cells. *Nature* **372**, 691 (1994).
- 2) Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H. and Roark, J. H. : Mouse CD1-specific NK1.1+ T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 535 (1997).
- 3) Taniguchi, M. and Nakayama, T. : Recognition and function of

- V $\alpha$ 14 NKT cells. *Semin. Immunol.* **12**, 543 (2000).
- 4) Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H. and Taniguchi, M. : CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V $\alpha$ 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* **278**, 1626 (1997).
- 5) Crompton, T., Pircher, H. and MacDonald, H. R. : CD4+8-thymocytes bearing major histocompatibility complex class I-restricted T cell receptors: evidence for homeostatic control of early stages of CD4/CD8 lineage development. *J. Exp. Med.* **176**, 903 (1992).
- 6) Eberl, G., Lees, R., Smiley, S. T., Taniguchi, M., Grusby, M. J. and MacDonald, H. R. : Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J. Immunol.* **162**, 6410 (1999).
- 7) Bannai, M., Kawamura, T., Naito, T., Kameyama, H., Abe, T., Kawamura, H., Tsukada, C., Watanabe, H., Hatakeyama, K., Hamada, H., Nishiyama, Y., Ishikawa, H., Takeda, K., Okumura, K., Taniguchi, M. and Abo, T. : Abundance of unconventional CD8(+) natural killer T cells in the large intestine. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3361 (2001).
- 8) Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M. and Taniguchi, M. : Requirement for V $\alpha$ 14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* **278**, 1623 (1997).
- 9) Hammond, K. J. and Godfrey, D. I. : NKT cells: Potential targets for autoimmune disease therapy? *Tissue Antigens* **59**, 353 (2002).
- 10) Prigozy, T. I., Sieling, P. A., Clemens, D., Stewart, P. L., Behar, S. M., Porcelli, S. A., Brenner M. B., Modlin, R. L. and Kronenberg, M. : The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity* **6**, 187 (1997).
- 11) Chiu, Y. H., Park, S. H., Benlagha, K., Forestier, C., Jayawardena-Wolf, J., Savage, P. B., Teyton, L. and Bendelac, A. : Multiple defects in antigen presentation and T cell development by mice expressing cytoplasmic tail-truncated CD1d. *Nat. Immunol.* **3**, 55 (2002).
- 12) Pamer, E. and Cresswell, P. : Mechanisms of MHC classI-related antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 323 (1998).
- 13) Smith-Jones, P. M., Solit, D. B., Akhurst, T., Afroze, F., Rosen, N. and Larson, S. M. : Imaging the pharmacodynamics of HER2 degradation in response to Hsp90 inhibitors. *Nat. Biotechnol.* **22**, 701 (2004).
- 14) Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M. and Plomann M. : All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *J. Cell Sci.* **113**, 4511 (2000).