

19980046

平成10年度

厚生科学研究費補助金厚生科学特別研究事業

研究報告書

平成11年3月

主任研究者 松田 道行

目 次

1. 総括研究報告書

癌抑制遺伝子産物 Rap1 を標的とした動脈硬化の遺伝子治療 1

主任研究者 松田 道行 国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部長

分担研究報告書

2. C3G を活性化する方法の開発 5

松田 道行 国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部長

3. 薬剤による導入遺伝子の発現誘導システムの検討 8

望月 直樹 国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部組織形態研究室長

1. 癌抑制遺伝子産物 Rap1 を標的とした動脈硬化の遺伝子治療

主任研究者 松田 道行 国立国際医療センター研究所臨床病理研究部長

研究要旨 血管平滑筋細胞や内皮細胞で過増殖を生ずる低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras の生理的アンタゴニストである Rap1 に着目し、Rap1 を活性化することで細胞増殖を抑制する方法を開発することを目的とした。本研究に当たり、Rap1 の細胞内での活性化因子 C3G と抑制因子 rap1GAPII について検討したところ、C3G の活性化には 504 番目のチロシン酸化が酵素活性の上昇に必須であることを見出した。さらに、C3G の試験管内での酵素活性測定法を確立し、今後 C3G 活性化薬あるいは抑制薬のスクリーニングに応用可能とした。また、rap1GAPII の活性化により増殖刺激の指標となる MAP キナーゼの活性化がおきることを明らかにした。C3G と同様に試験管内での水解反応を測定する方法を確立し、rap1GAPII の抑制薬の開発へも今後発展される。遺伝子治療への試みとして、Cre/loxP システムを用いたアデノウイルス感染による一過性の細胞での発現を可能としたことから今後生体での C3G あるいは rap1GAPII の発現を誘導することによる Rap1 制御により動脈硬化症の治療への応用も期待される。

分担研究者

望月 直樹 国立国際医療センター研究所
臨床病理研究部組織形態研究室室長

A. 研究目的

低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras に拮抗的に作用する Rap1 の活性化機構特に活性化因子 C3G と非活性化因子 rap1GAPII による Rap1 調節機構を検討し、動脈硬化症における Rap1 の制御を試み、血管平滑筋・内皮細胞の過増殖抑制を試みる。

B. 研究方法

(1) CrkI 依存性 C3G の活性化機構の解明

① プラスミド：pCAGGS-CrkI は野生型の CrkI を発現するプラスミドである。CrkI-R38V 変異体と W169L 変異体は、それぞれ SH2 及び SH3 ドメインの機能消失型の変異がある CrkI である。PCAGGS-C3G および pCAGGS-C3GF は野生型および膜移行シグナルを付加した C3G を発現するベクターである。PEBG-Rap1 と pEBG-C3G は GST タグをつけた Rap1 および C3G を発現するベクターである。全長および短くした C3G の cDNA を PCR で増幅し pCAGGS-His ベクターにサブクローニングした。PCAGGS-His-C3G-d61, d-390, d-579 はそれぞれ、N 末のアミノ酸 61 番目まで、390 番まで及び 579 番目までを削除した変異体である。また、チロシンをフェニルアラニンに置換した変異体も PCR を用いて作製した。

② 抗体、細胞培養およびトランスフェクション：Crk および C3G に対する抗体は、当研究室で作成した。抗 Crk モノクローナル抗

体およびペルオキシダーゼ標識抗リン酸化チロシン抗体 RC20 は、Transduction Lab より購入した。C3G の抗体の一つは Santa Cruz 社より購入した。COS1, 3Y1, SR-3Y1, HR-3Y1 は JCRB および ATCC より購入した。これらの細胞はダルベッコ変法 イーグル最小培地に 10%牛胎児血清を加えたもので培養した。DNA はデキストラン法によりトランスフェクトした。

③ グアニンヌクレオチド交換活性の測定：105 個の COS 細胞を 35mm 径の培養皿に撒き、0.2mg の発現 DNA を DEAE デキストラン法により導入した。48 時間後に 50mCi の ³²P 正リン酸で 2 時間標識した。GST タグ付き Rap1 をグルタチオンセファロースで回収する。Rap1 に結合しているグアニンヌクレオチドを薄層クロマトグラフィーで分離した。標識されたグアニンヌクレオチドは Molecular Imager(Bio Rad)で検出・定量化した。蛋白の発現確認には、アイソトープで標識する以外は同様に処理し、SDS-PAGE で分離した後、イムノプロットを用いた。

(2) C3G の試験管内での酵素活性測定法の樹立

① 酵素 C3G、基質 Rap1 の精製：pGEX-C3G, pGEX-Rap1 は大腸菌でそれぞれの蛋白を発現させるベクターである。大腸菌 AD202 株に pGEX-C3G を導入する。これを 25℃で OD600 が 1 になるまで培養し、IPTG を最終濃度 0.1mM になるように加える。この状態で一晩培養する。翌日、集菌した後 Triton-X を含む緩衝液で可溶化する。GST タグ付きとして産出された Rap1 はグルタ

チオンセファロースのビーズで回収した。

- ② 試験管内での Guanine nucleotide exchange activity の測定: Rap1 は 3.2mM 3H-GDP, 1mM MgCl₂, 20mM EDTA, 100mM NaCl, 10mM 2-mercaptoethanol, 5% glycerol, 1mg/ml BSA 中で 5 分間 30°C で反応させアイソトープ標識する。ここに、MgCl₂ を 30mM になるように加え、さらに GTP と C3G を入れて交換反応を 30°C で 20 分行う。反応は、過剰量の 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM MgCl₂, 50mM NaCl を加えることにより停止させる。Rap1 はニトロセルロース膜で回収し液体シンチレーションカウンター存在下で Rap1 に残っている 3H-GDP を測定した。

(3) rap1GAPII の活性化による MAP キナーゼ活性化機構の解明

- ① プラスミド: pCXN2-Flag-Rap1 は Rap1 に pCXN2-Flag-Ras は Ras にそれぞれ Flag タグが付いた細胞発現ベクターである。pEBG, pEBG-rap1GAPII、はそれぞれ、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ), GST と rap1GAPII の融合蛋白質発現ベクターである。Rap1, Ras, rap1GAPII の cDNA は PCR 法を用いて増幅しそれぞれプラスミドの XhoI/NotI 切断部位に挿入した。ムスカリン受容体 (M2 型) 発現ベクターは pEF-M2 を使用した。
- ② 細胞培養およびトランスフェクション: HEK293T 細胞, NIH3T3 細胞はダルベッコ変法イーグル最小培地に 10% 牛胎児血清を加えたもので培養した。プラスミドの導入は 293T 細胞にはリン酸カルシウム法, NIH3T3 細胞には Superfect (Bohlinger 社) を用いた。
- ③ 抗体と Western プロット法: rap1GAPII, Rap1, Ras の発現確認はそれぞれ、anti-GST, anti-Flag を用いた。また、細胞内 Rap1 は Transduction 社製抗 Rap1 抗体を用いた。抗リン酸化 MAP キナーゼ抗体は New England Biolab 社より購入した。抗 Flag, 抗 His 抗体はそれぞれ、Sigma 社, Bohlinger 社より購入した。検出は ECL (Enhanced Chemiluminescence 法) により行った。
- ④ 活性化型 Rap1 の測定: 細胞を可溶性バッファー (150mM NaCl, 25mM Tris, 1% NP-40, 10mM MgCl₂, PMSF, Leupeptin, Sodium Vanadate, 10% Glycerol) で溶解後、GST-RalGDS-RBD (Ras binding domain) ビーズと 4°C で 1 時間混和することにより GTP 結合型 Rap1 と結合させ、遠心により沈降させ、

SDS-サンプルバッファーで溶出し SDS-PAGE 後 PVDF 膜にトランスファーし、抗 Rap1 抗体あるいは抗 Flag 抗体を用いて検出した。

(4) rap1GAPII の試験管内での水解反応活性の測定系の確立

試験管内 GAP 活性の測定: 基質 Rap1 は大腸菌から精製した。Rap1GAPII はバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ同細胞より精製したものをを用いた。Rap1 は最終濃度 0.1mg/ml で、15mM EDTA, 1.5 mM γ -³²P-GTP (40-80 Ci/mmol) の存在下 30°C で 5 分間交換反応を行った。標識された Rap1 溶液と各濃度の rap1GAPII 溶液を 5mM MgCl₂ 存在下で混合、30 度で反応し、経過時間毎のカウントをシンチレーターで測定した。氷上で放置したものを 100% とし、カウントの減少分を GAP activity (水解反応活性) とした。

(5) Cre/LoxP システムを用いたアデノウイルスによる細胞での一過性 rap1GAPII 発現

核 DNA (細胞・個体) に恒常的に挿入された rap1GAPII を Cre recombinase という酵素を発現させるアデノウイルスを感染させることにより一過性に発現させる。

C. 研究結果

(1) CrkI 依存性 C3G の活性化機構の解明

1. C3G-F (膜移行シグナル型) も C3G 野生型と同様に、CrkI の存在下で活性化を受けることが明らかになった。イムノプロットで確認したところ、C3G は CrkI の発現によりチロシンリン酸化をうけることがわかった。
2. CrkI の変異体を用いた実験により、SH2 及び SH3 の変異体では、C3G の活性化を誘導できないことがわかった。
3. v-Crk および v-Src 癌遺伝子を発現した細胞 (3Y1) では C3G が顕著にリン酸化されていた。
4. 様々な欠失変異体 C3G を用いた検討で 390 番まで欠失したものはリン酸化が保たれていたが、579 番目まで欠失したものはチロシンリン酸化を受けないことがわかった。
5. C3G の 390 番から 579 番のアミノ酸領域に C3G の酵素活性を負に制御する領域があり、これが、チロシンリン酸化により脱制御を受けることが示唆された。
6. 390-579 番のなかのチロシンのすべてをフェニルアラニンに置換した変異体を用いた

検討により、504番のチロシンリン酸化がC3Gの酵素活性の上昇に必須であることを見出した。

- (2) C3Gの試験管内での酵素活性測定法の樹立
 1. C3G精製の至適条件の決定を行ったところ、37℃では非可溶性画分に回収されたが、25℃でIPTGの濃度を0.1mMに下げたところ可溶性画分に回収される量が増加し、実験に使用するのに十分な量を確保することができた。
 2. 大腸菌で精製したC3GはRap1上の³H-GDPをGTPに置換することがわかった。つまり、C3GのRap1に対するグアニンヌクレオチド交換活性を測定することが試験管内で可能となった。
- (3) rap1GAPIIの活性化によるMAPキナーゼ活性化機構の解明
 1. M2型ムスカリン受容体は三量体GTP結合蛋白質Gi活性化しさらにrap1GAPIIの活性化を起こすことが明らかになった。
 2. 血栓形成時に血小板から分泌されると考えられるLPA刺激によるGTP結合型Rap1の変化について検討した。LPA受容体(Edg-2)は、ほとんどの細胞で発現しているため、NIH3T3細胞をそのままLPAで刺激することによりRap1の変化をみるのが可能である。無血清培地で48時間培養後LPA添加により速やかにGTP結合型Rap1が減少しこの作用は1時間続いた。
 3. rap1GAPII発現によるMAPキナーゼ活性化への影響をしらべたところ、rap1GAPIIを発現した細胞でMAPキナーゼの有意な活性化が認められたことから、Rap1のrap1GAPIIによる抑制によりMAPキナーゼの活性化がおこることが明らかとなった。
- (4) rap1GAPIIの試験管内での水解反応活性の測定系の確立
 1. 大腸菌で精製したRap1に対してバキュロウイルスから精製したrap1GAPIIが水解反応を促進することがわかった。今後、この反応を充分に行えるだけの基質・酵素の精製ができた。
 2. 今後、rap1GAPIIの水解反応を制御する薬剤の開発に応用できる至適条件の設定ができた。
- (5) Cre/LoxPシステムを用いたアデノウイルスによる細胞での一過性rap1GAPII発現
 1. NIH3T3細胞・Hela細胞にlox-neo-lox

rap1GAPII DNAを恒常的に導入した。この遺伝子はCreを発現させるアデノウイルスを感染させることでrap1GAPIIを一時的に発現させることができた。

2. 同様な方法でトランスジェニックマウスを作成した。今後アデノウイルス感染により臓器・組織でrap1GAPIIの発現を確認する予定である。

D. 考察

本研究でRap1の活性化機構が明らかになった。特にC3Gにおいては、様々なアミノ酸の置換体・変異体を用いた詳細な検討により、C3Gのアミノ末端に負の調節領域が存在しチロシン504がリン酸化されることによりこの制御が解除されC3Gの活性化が生ずることがあきらかとなった。このような、負の活性領域が存在することは他のグアニンヌクレオチド交換因子でも明らかにされてきており、様々な外来刺激によりこの負の制御が解除されることで酵素の活性化がおきることがわかった。

Rap1GAPIIは当研究室で新たに同定された分子で非常に興味深い制御をうけることがわかった。Rap1は低分子量GTP結合蛋白質であるが、この分子が三量体GTP結合蛋白質Giにより制御をうけるということが明らかになった。特に動脈硬化巣や血栓形成部位で活性化されている血小板から分泌されるLPA(リゾフォスファチジン酸)受容体の刺激によりrap1GAPIIが活性化されMAPキナーゼ活性化と引き続く細胞増殖刺激になっていることが示唆された。このことから、rap1GAPII制御により動脈硬化における細胞の過増殖をrap1GAPII抑制により調節する可能性も示唆された。

C3Gのグアニンヌクレオチド交換活性の測定法・rap1GAPIIの試験管内での水解反応活性の測定系の確立によりそれぞれの活性化薬剤・非活性化薬剤のスクリーニングを行うことも今後可能となった。C3Gの活性化により、Rap1を活性化しRasに対する拮抗作用の増強を図る治療方法或いはrap1GAPIIを抑制することでRap1の活性化を維持しRasに対する拮抗作用を維持する治療方法など今後のスクリーニングに期待される。

NIH3T3細胞・Hela細胞にlox-neo-lox rap1GAPII DNAを恒常的に導入した。この遺伝子はCreを発現させるアデノウイルスを感染させることでrap1GAPIIを一時的に発現させることができた。以上から動脈硬化巣においてrap1GAPII或いはC3Gを一時的に発現することによりRap1を制御できる可能性が示唆された。

E. 結論

Rap1 活性化因子 C3G は CrkI 依存性リン酸化を受け、Rap1 の水解促進因子 rap1GAPII は三量体 GTP 結合蛋白質 Gi により制御をうけることが判明した。また、それぞれの活性測定方法を確立したので、今後 Rap1 制御薬の開発が可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Dolfi, F., M. Garcia-Guzman, M. Ojaniemi, H. Nakamura, M. Matsuda, and K. Vuori. 1998. The adapter protein Crk regulates the JNK signaling pathway in response to multiple cellular stimuli. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:15394-15399.
2. Hashimoto, Y., H. Katayama, E. Kiyokawa, S. Ota, T. Kurata, N. Gotoh, M. Shibata, N. Otsuka, and M. Matsuda. 1998. Phosphorylation of CrkII adaptor protein at Tyrosine 221 by epidermal growth factor receptor. *J.Biol.Chem.* 273:17186-17191.
3. Ota, S., S. Kizaka-Kondoh, Y. Hashimoto, H. Nishihara, K. Nagashima, T. Kurata, H. Okayama, and M. Matsuda. 1998. Constitutive association of EGF receptor with the CrkII-23 mutant that inhibits transformation of NRK cells by EGF and TGF- β . *Cell.Signal.* 10:283-290.
4. Kawasaki, H., G.M. Springett, S. Toki, J.J. Canales, P. Harlan, J.P. Blumenstiel, E.J. Chen, I.A. Bany, N. Mochizuki, A. Ashbacher, M. Matsuda, D.E. Housman, and A.M. Graybiel. 1998. A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched in the basal ganglia. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:13278-13283.
5. Kawasaki, H., G.M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D.E. Housman, and A.M. Graybiel. 1998. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282:2275-2279.
6. Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, S. Kobayashi, H. Sugimura, T. Kurata, and M. Matsuda. 1998. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 12:3331-3336.
7. Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, T. Kurata, H. Sugimura, and M. Matsuda. 1998. Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130Cas complex. *J.Biol.Chem.* 273:24479-24484.
8. Okada, S., M. Matsuda, M. Anafi, T. Pawson, and J.E. Pessin. 1998. Insulin regulates the dynamic balance between Ras and Rap1 signaling by coordinating the assembly states of the Grb2-SOS and CrkII-C3G complexes. *EMBO J.* 17:2554-2565.
9. Ichiba, T., Y. Hashimoto, M. Nakaya, Y. Kuraishi, S. Tanaka, T. Kurata, N. Mochizuki, and M. Matsuda. 1999. Activation of C3G guanine

nucleotide exchange factor for Rap1 by phosphorylation of tyrosine-504. *J.Biol.Chem.* (In Press)

2. 学会発表

国際学会

1. Kiyokawa, E., Tokunaga, K., Adachi, A., Otsuka, N., Kojima, A., Kurata, T., and Matsuda, M.: Inhibition of HIV-1 virion entry by a dominant negative Hck. A Keystone Symposium, HIV Pathogenesis and Treatment. Park City, U.S.A., March 1998.
2. Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kurata, T., and Matsuda, M.: Involvement of CRKII-DOCK180 complex in the integrin signaling. The 14th Annual Meeting on Oncogenes. The Salk Institute, La Jolla, U.S.A., June 1998.
3. Nishihara, H., Kobayashi, S., Kiyokawa, E., Nagashima, K., Kurata, T., Mochizuki, N., and Matsuda, M.: Hematopoietic cell specific expression of M-DOCK, a member of DOCK180-family protein. The 14th Annual Meeting on Oncogenes. The Salk Institute, La Jolla, U.S.A., June 1998.

国内学会

1. 西原広史、清川悦子、倉田毅、松田道行、長嶋和郎：血球細胞特異的に発現する M-DOCK 蛋白の機能の解析 第 87 回日本病理学会総会 広島 平成 10 年 4 月
2. 清川悦子、松田道行：Crk-DOCK180 複合体を介したインテグリンからの情報伝達 第 71 回日本生化学会総会 名古屋 平成 10 年 10 月
3. 橋本裕子、市場保、中矢実江、大塚尚美、田中伸哉、倉田毅、松田道行：グアニンヌクレオチド交換因子 C3G の活性調節機構の考察 第 71 回日本生化学会総会 名古屋 平成 10 年 10 月
4. 清川悦子、徳永研三、中矢実江、大塚尚美、倉田毅、小島朝人、松田道行：チロシンリン酸化酵素による HIV 粒子の感染効率の制御 第 46 回日本ウイルス学会総会 東京平成 10 年 10 月
5. 望月直樹、清川悦子、松田道行：三量体 GTP 結合蛋白質 Gi に結合する rapGAP アイソフォームによる MAP キナーゼの制御 第 57 回日本癌学会総会 横浜 平成 10 年 9 月 30 日～10 月 2 日
6. 中矢実江、市場保、橋本裕子、大塚尚美、倉田毅、松田道行：C3G のチロシンリン酸化による活性制御 第 21 回日本分子生物学会年会 横浜 平成 10 年 12 月

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

2. C3G を活性化する方法の開発

分担研究者 松田 道行 国立国際医療センター研究所臨床病理研究部長

研究要旨 血管平滑筋細胞や内皮細胞で過増殖を生ずる低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras の生理的アンタゴニストである Rap1 に着目し、Rap1 を活性化することで細胞増殖を抑制する方法を開発することを目的とした。本研究に当たり、Rap1 の細胞内での活性化因子 C3G について検討したところ、C3G の活性化には 504 番目のチロシンリン酸化が酵素活性の上昇に必須であることを見出した。さらに、C3G の試験管内での酵素活性測定法を確立し、今後 C3G 活性化薬あるいは抑制薬のスクリーニングに応用可能とした。

A. 研究目的

低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras に拮抗的に作用する Rap1 の活性化機構特に活性化因子 C3G による Rap1 調節機構を検討し、動脈硬化症における Rap1 の制御を試み血管平滑筋・内皮細胞の過増殖抑制を試みる。

B. 研究方法

(1) CrkI 依存性 C3G の活性化機構の解明

① プラスミド：pCAGGS-CrkI は野生型の CrkI を発現するプラスミドである。CrkI-R38V 変異体と W169L 変異体は、それぞれ SH2 及び SH3 ドメインの機能消失型の変異がある CrkI である。PCAGGS-C3G および pCAGGS-C3GF は野生型および膜移行シグナルを付加した C3G を発現するベクターである。PEBG-Rap1 と PEBG-C3G は GST タグをつけた Rap1 および C3G を発現するベクターである。全長および短くした C3G の cDNA を PCR で増幅し pCAGGS-His ベクターにサブクローニングした。PCAGGS-His-C3G-d61, d-390, d-579 はそれぞれ、N 末のアミノ酸 61 番目まで、390 番まで及び 579 番目までを削除した変異体である。また、チロシンをフェニルアラニンに置換した変異体も PCR を用いて作製した。

② 抗体、細胞培養およびトランスフェクション：Crk および C3G に対する抗体は、当研究室で作成した。抗 Crk モノクローナル抗体およびペルオキシダーゼ標識抗リン酸化チロシン抗体 RC20 は、Transduction Lab より購入した。C3G の抗体の一つは Santa Cruz 社より購入した。COS1, 3Y1, SR-3Y1, HR-3Y1 は JCRB および ATCC より購入した。これらの細胞はダルベッコ変法 イーグル最小培地に 10%牛胎児血清を加えたもので培養した。DNA はデキストラン法によりトランスフェクトした。

③ グアニンヌクレオチド交換活性の測定：105 個の COS 細胞を 35mm 径の培養皿に撒き、0.2mg の発現 DNA を DEAE デキストラン法により導入した。48 時間後に 50mCi の ³²P 正リン酸で 2 時間標識した。GST タグ付き Rap1 をグルタチオンセファロースで回収する。Rap1 に結合しているグアニンヌクレオチドを薄層クロマトグラフィーで分離した。標識されたグアニンヌクレオチドは Molecular Imager (Bio Rad)で検出・定量化した。蛋白の発現確認には、アイソトープで標識する以外は同様に処理し、SDS-PAGE で分離した後、イムノプロットを用いた。

(2) C3G の試験管内での酵素活性測定法の樹立

① 酵素 C3G、基質 Rap1 の精製：pGEX-C3G, pGEX-Rap1 は大腸菌でそれぞれの蛋白を発現させるベクターである。大腸菌 AD202 株に pGEX-C3G を導入する。これを 25℃で OD600 が 1 になるまで培養し、IPTG を最終濃度 0.1mM になるように加える。この状態で一晩培養する。翌日、集菌した後 Triton-X を含む緩衝液で可溶化する。GST タグ付きとして産出された Rap1 はグルタチオンセファロースのビーズで回収した。

② 試験管内でのグアニンヌクレオチド交換活性の測定：Rap1 は 3.2mM ³H-GDP, 1mM MgCl₂, 20mM EDTA, 100mM NaCl, 10mM 2-mercaptoethanol, 5% glycerol, 1mg/ml BSA 中で 5 分間 30℃で反応させアイソトープ標識する。ここに、MgCl₂ を 30mM になるように加え、さらに GTP と C3G を入れて交換反応を 30℃で 20 分行う。反応は、過剰量の 20mM Tris-HCl(pH 8.0), 5mM MgCl₂, 50mM NaCl を加えることにより停止させる。Rap1 はニトロセルロース膜で回収し液体シンチレーションカウンター存在下で Rap1 に残っている ³H-GDP を測定した。

C. 研究結果

(1) CrkI 依存性 C3G の活性化機構の解明

1. C3G-F(膜移行シグナル型)も C3G 野生型と同様に、CrkI の存在下で活性化を受けることが明らかになった。イムノプロットで確認したところ、C3G は CrkI の発現によりチロシンリン酸化をうけることがわかった。
2. CrkI の変異体を用いた実験により、SH2 及び SH3 の変異体では、C3G の活性化を誘導できないことがわかった。
3. v-Crk および v-Src 癌遺伝子を発現した細胞(3Y1)では C3G が顕著にリン酸化されていた。
4. 様々な欠失変異体 C3G を用いた検討で 390 番まで欠失したものではリン酸化が保たれていたが、579 番目まで欠失したものではチロシンリン酸化を受けないことがわかった。
5. C3G の 390 番から 579 番のアミノ酸領域に C3G の酵素活性を負に制御する領域があり、これが、チロシンリン酸化により脱制御を受けることが示唆された。
6. 390-579 番のなかのチロシンのすべてをフェニルアラニンに置換した変異体を用いた検討により、504 番のチロシンリン酸化が C3G の酵素活性の上昇に必須であることを見出した。

(2) C3G の試験管内での酵素活性測定法の樹立

1. C3G 精製の至適条件の決定を行ったところ、37℃では非可溶性画分に回収されたが、25℃で IPTG の濃度を 0.1mM に下げたところ可溶性画分に回収される量が増加し、実験に使用するのに十分な量を確保することができた。
2. 大腸菌で精製した C3G は Rap1 上の ³H-GDP を GTP に置換することがわかった。つまり、C3G の Rap1 に対するグアニンヌクレオチド交換活性を測定することが試験管内で可能となった。

D. 考察

本研究で Rap1 の活性化機構が明らかになった。特に C3G においては、様々なアミノ酸の置換体・変異体を用いた詳細な検討により、C3G のアミノ末端に負の調節領域が存在しチロシン 504 がリン酸化されることによりこの制御が解除され C3G の活性化が生ずることが明らかとなった。このような、負の活性領域が存在することは他のグアニンヌクレオチド交換因子でも明らかにされてきてお

り、様々な外来刺激によりこの負の制御が解除されると酵素の活性化がおきることがわかった。C3G のグアニンヌクレオチド交換活性の測定法の確立により C3G の活性化薬のスクリーニングを行うことも今後可能となった。C3G の活性化により、Rap1 を活性化し Ras に対する拮抗作用の増強を図る治療方法のための薬の今後のスクリーニングに利用されることが期待される。

E. 結論

Rap1 活性化因子 C3G は CrkI 依存性リン酸化を受けることが判明した。また、C3G の活性測定方法を確立したので、今後 Rap1 制御薬の開発が可能となった

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Dolfi, F., M. Garcia-Guzman, M. Ojaniemi, H. Nakamura, M. Matsuda, and K. Vuori. 1998. The adapter protein Crk regulates the JNK signaling pathway in response to multiple cellular stimuli. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:15394-15399.
2. Hashimoto, Y., H. Katayama, E. Kiyokawa, S. Ota, T. Kurata, N. Gotoh, M. Shibata, N. Otsuka, and M. Matsuda. 1998. Phosphorylation of CrkII adaptor protein at Tyrosine 221 by epidermal growth factor receptor. *J.Biol.Chem.* 273:17186-17191.
3. Ota, S., S. Kizaka-Kondoh, Y. Hashimoto, H. Nishihara, K. Nagashima, T. Kurata, H. Okayama, and M. Matsuda. 1998. Constitutive association of EGF receptor with the CrkII-23 mutant that inhibits transformation of NRK cells by EGF and TGF- β . *Cell.Signal.* 10:283-290.
4. Kawasaki, H., G.M. Springett, S. Toki, J.J. Canales, P. Harlan, J.P. Blumenstiel, E.J. Chen, I.A. Bany, N. Mochizuki, A. Ashbacher, M. Matsuda, D.E. Housman, and A.M. Graybiel. 1998. A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched in the basal ganglia. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:13278-13283.
5. Kawasaki, H., G.M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D.E. Housman, and A.M. Graybiel. 1998. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282:2275-2279.
6. Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, S. Kobayashi, H. Sugimura, T. Kurata, and M. Matsuda. 1998. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 12:3331-3336.
7. Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, T. Kurata, H. Sugimura, and M. Matsuda. 1998. Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130Cas complex. *J.Biol.Chem.* 273:24479-24484.
8. Okada, S., M. Matsuda, M. Anafi, T. Pawson, and J.E. Pessin. 1998. Insulin regulates the dynamic

balance between Ras and Rap1 signaling by coordinating the assembly states of the Grb2-SOS and CrkII-C3G complexes. EMBO J. 17:2554-2565.

9. Ichiba, T., Y. Hashimoto, M. Nakaya, Y. Kuraishi, S. Tanaka, T. Kurata, N. Mochizuki, and M. Matsuda. 1999. Activation of C3G guanine nucleotide exchange factor for Rap1 by phosphorylation of tyrosine-504. J.Biol.Chem. (In Press)

2. 学会発表

国際学会

1. Kiyokawa, E., Tokunaga, K., Adachi, A., Otsuka, N., Kojima, A., Kurata, T., and Matsuda, M.: Inhibition of HIV-1 virion entry by a dominant negative Hck. A Keystone Symposium, HIV Pathogenesis and Treatment. Park City, U.S.A., March 1998.
2. Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kurata, T., and Matsuda, M.: Involvement of CRKII-DOCK180 complex in the integrin signaling. The 14th Annual Meeting on Oncogenes. The Salk Institute, La Jolla, U.S.A., June 1998.
3. Nishihara, H., Kobayashi, S., Kiyokawa, E., Nagashima, K., Kurata, T., Mochizuki, N., and Matsuda, M.: Hematopoietic cell specific expression of M-DOCK, a member of DOCK180-family protein. The 14th Annual Meeting on Oncogenes. The Salk Institute, La Jolla, U.S.A., June 1998.

国内学会

1. 西原広史、清川悦子、倉田毅、松田道行、長嶋和郎：血球細胞特異的に発現する M-DOCK 蛋白の機能の解析 第 87 回日本病理学会総会 広島 平成 10 年 4 月
2. 清川悦子、松田道行：Crk-DOCK180 複合体を介したインテグリンからの情報伝達 第 71 回日本生化学会総会 名古屋 平成 10 年 10 月
3. 橋本裕子、市場保、中矢実江、大塚尚美、田中伸哉、倉田毅、松田道行：Guanine nucleotide exchange factor C3G の活性調節機構の考察 第 71 回日本生化学会総会 名古屋 平成 10 年 10 月
4. 清川悦子、徳永研三、中矢実江、大塚尚美、倉田毅、小島朝人、松田道行：チロシンリン酸化酵素による HIV 粒子の感染効率の制御 第 46 回日本ウイルス学会総会 東京平成 10 年 10 月
5. 望月直樹、清川悦子、松田道行：三量体 GTP 結合蛋白質 Gi に結合する rapGAP アイソフォームによる MAP キナーゼの制御 第 57 回日本癌学会総会 横浜 平成 10 年 9 月 30 日～10 月 2 日
6. 中矢実江、市場保、橋本裕子、大塚尚美、倉田毅、松田道行：C3G のチロシンリン酸化による活性制御 第 21 回日本分子生物学会年会 横浜 平成 10 年 12 月

3. 薬剤による導入遺伝子の発現誘導システムの検討

分担研究者 望月 直樹 国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部組織形態研究室長

研究要旨 Rap1 の細胞内での抑制因子 rap1GAPII について検討したところ、rap1GAPII の活性化により増殖刺激の指標となる MAP キナーゼの活性化がおきることを明らかにした。試験管内での水解反応を測定する方法を確立し、rap1GAPII の抑制薬の開発へも今後発展されうる。遺伝子治療への試みとして、Cre/loxP システムを用いたアデノウイルス感染による一過性の細胞での発現を可能としたことから今後生体での rap1GAPII の発現を誘導することによる Rap1 制御により動脈硬化症の治療への応用も期待される。

A. 研究目的

低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras に拮抗的に作用する Rap1 の活性化機構特に非活性化因子 rap1GAPII による Rap1 調節機構を検討し、動脈硬化症における Rap1 の制御を試み、血管平滑筋・内皮細胞の過増殖抑制を試みる。

B. 研究方法

(1) rap1GAPII の活性化による MAP キナーゼ活性化機構の解明

① プラスミド：pCXN2-Flag-Rap1 は Rap1 に pCXN2-Flag-Ras は Ras にそれぞれ Flag タグが付いた細胞発現ベクターである。pEBG、pEBG-rap1GAPII、はそれぞれ、GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、GST と rap1GAPII の融合蛋白質発現ベクターである。Rap1、Ras、rap1GAPII の cDNA は PCR 法を用いて増幅しそれぞれプラスミドの XhoI/NotI 切断部位に挿入した。ムスカリン受容体(M2 型)発現ベクターは pEF-M2 を使用した。

② 細胞培養およびトランスフェクション：HEK293T 細胞、NIH3T3 細胞はダルベッコ変法イーグル最小培地に 10%牛胎児血清を加えたもので培養した。プラスミドの導入は 293T 細胞には磷酸カルシウム法、NIH3T3 細胞には Superfect (Bohlinger 社)を用いた。

③ 抗体と Western プロット法：rap1GAPII、Rap1、Ras の発現確認はそれぞれ、anti-GST、anti-Flag を用いた。また、細胞内 Rap1 は Transduction 社製抗 Rap1 抗体を用いた。抗リン酸化 MAP キナーゼ抗体は New England Biolab 社より購入した。抗 Flag、抗 His 抗体はそれぞれ、Sigma 社、Bohlinger 社より購入した。検出は ECL (Enhanced Chemiluminescence 法) により行った。

④ 活性化型 Rap1 の測定：細胞を可溶性バッファ (150mM NaCl, 25mM Tris, 1% NP-40, 10mM MgCl₂, PMSF, Leupeptin, Sodium

Vanadate, 10% Glycerol) で溶解後、GST-ralGDS-RBD (Ras binding domain) ビーズと 4℃で1時間混和することにより GTP 結合型 Rap1 と結合させ遠心により沈降させ、SDS-サンプルバッファーで溶出し SDS-PAGE 後 PVDF 膜にトランスファーし、抗 Rap1 抗体あるいは抗 Flag 抗体を用いて検出した。

(2) rap1GAPII の試験管内での水解反応活性の測定系の確立

試験管内 GAP 活性の測定：基質 Rap1 は大腸菌から精製した。Rap1GAPII はバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ同細胞より精製したものをを用いた。Rap1 は最終濃度 0.1mg/ml で、15mM EDTA、1.5 mM γ -³²P-GTP (40-80 Ci/mmol)の存在下 30℃で 5 分間交換反応を行なった。標識された Rap1 溶液と各濃度の rap1GAPII 溶液を 5mM MgCl₂ 存在下で混合、30 度で反応し、経過時間毎のカウントをシンチレーターで測定した。氷上で放置したものを 100%とし、カウントの減少分を GAP activity (水解反応活性)とした。

(3) Cre/LoxP システムを用いたアデノウイルスによる細胞での一過性 rap1GAPII 発現

核 DNA (細胞・個体) に恒常的に挿入された rap1GAPII を Cre recombinase という酵素を発現させるアデノウイルスを感染させることにより一過性に発現させる。

C. 研究結果

(1) rap1GAPII の活性化による MAP キナーゼ活性化機構の解明

1. M2 型ムスカリン受容体は三量体 GTP 結合蛋白質 Gi 活性化しさらに rap1GAPII の活性化を起こすことが明らかになった。
2. 血栓形成時に血小板から分泌されると考えられる LPA 刺激による GTP 結合型 Rap1 の変化について検討した。LPA 受容体 (Edg-

2) は、ほとんどの細胞で発現しているため、NIH3T3 細胞をそのまま LPA で刺激することにより Rap1 の変化をみるのが可能である。無血清培地で 48 時間培養後 LPA 添加により速やかに GTP 結合型 Rap1 が減少しこの作用は 1 時間続いた。

3. rap1GAPII 発現による MAP キナーゼ活性化への影響をしらべたところ、rap1GAPII を発現した細胞で MAP キナーゼの有意な活性化が認められたことから、Rap1 の rap1GAPII による抑制により MAP キナーゼの活性化がおこることが明らかとなった。

(2) rap1GAPII の試験管内での水解反応活性の測定系の確立

1. 大腸菌で精製した Rap1 に対してバキュロウイルスから精製した rap1GAPII が水解反応を促進することがわかった。今後、この反応を充分に行えるだけの基質・酵素の精製ができた。
2. 今後、rap1GAPII の水解反応を制御する薬剤の開発に応用できる至適条件の設定ができた。

(3) Cre/LoxP システムを用いたアデノウイルスによる細胞での一過性 rap1GAPII 発現

1. NIH3T3 細胞・Hela 細胞に lox-neo-lox rap1GAPII DNA を恒常的に導入した。この遺伝子は Cre を発現させるアデノウイルスを感染させることで rap1GAPII を一時的に発現させることができた。
2. 同様な方法でトランスジェニックマウスを作成した。今後アデノウイルス感染により臓器・組織で rap1GAPII の発現を確認する予定である。

D. 考察

Rap1GAPII は当研究室で新たに同定された分子で非常に興味深い制御をうけることがわかった。Rap1 は低分子量 GTP 結合蛋白質であるが、この分子が三量体 GTP 結合蛋白質 Gi により制御をうけるということが明らかになった。特に動脈硬化巣や血栓形成部位で活性化されている血小板から分泌される LPA(リゾフォスファチジン酸)受容体の刺激により rap1GAPII が活性化され MAP キナーゼ活性化と引き続く細胞増殖刺激になっていることが示唆された。このことから、rap1GAPII 制御により動脈硬化における細胞の過増殖を rap1GAPII 抑制により調節する可能性も示唆された。

rap1GAPII の試験管内での水解反応活性の測定

系の確立により活性化薬・非活性化薬のスクリーニングを行うことも今後可能となった。rap1GAPII を抑制することで Rap1 の活性化を維持し Ras に対する拮抗作用を維持する治療方法など今後のスクリーニングに期待される。

E. 結論

Rap1 の水解促進因子 rap1GAPII は三量体 GTP 結合蛋白質 Gi により制御をうけることが判明した。また、試験管内での水解活性測定方法を確立したので、今後 Rap1 制御薬の開発が可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawasaki, H., G.M. Springett, S. Toki, J.J. Canales, P. Harlan, J.P. Blumenstiel, E.J. Chen, I.A. Bany, N. Mochizuki, A. Ashbacher, M. Matsuda, D.E. Housman, and A.M. Graybiel. 1998. A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched in the basal ganglia. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:13278-13283.
2. Kawasaki, H., G.M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D.E. Housman, and A.M. Graybiel. 1998. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. Science 282:2275-2279.
3. Ichiba, T., Y. Hashimoto, M. Nakaya, Y. Kuraishi, S. Tanaka, T. Kurata, N. Mochizuki, and M. Matsuda. 1999. Activation of C3G guanine nucleotide exchange factor for Rap1 by phosphorylation of tyrosine-504. J.Biol.Chem. (In Press)

2. 学会発表

国際学会

1. Nishihara, H., Kobayashi, S., Kiyokawa, E., Nagashima, K., Kurata, T., Mochizuki, N., and Matsuda, M.: Hematopoietic cell specific expression of M-DOCK, a member of DOCK180-family protein. The 14th Annual Meeting on Oncogenes. The Salk Institute, La Jolla, U.S.A., June 1998.

国内学会

1. 望月直樹、清川悦子、松田道行：三量体 GTP 結合蛋白質 Gi に結合する rapGAP アイソフォームによる MAP キナーゼの制御 第 57 回日本癌学会総会 横浜 平成 10 年 9 月 30 日～10 月 2 日