

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

# 目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

## 癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を 標的とする薬剤の探索

所 属 国立国際医療センター研究所臨床病理研究部  
研究者 松田 道行

分担研究者

前川 隆司 シオノギ製薬 (株)中央研究所

### 要 旨

新規のRasファミリーG蛋白の活性化因子の解析を行った。この蛋白は、カルシウムと脂質により制御されるCalDAGファミリーの活性化因子に属するもので、CalDAG-GEFIIIと命名された。CalDAG-GEFIIIはRasファミリーG蛋白のうち、H-Ras、R-Ras、Rap1を活性化し、RasファミリーG蛋白のGEFのほとんど全てを活性化できることがわかった。これはこれまで知られている活性化因子の中ではもっとも広い基質特異性をもつものである。これらの結果は、試験管内でも確認できた。CalDAG-GEFIIIは組織分布に特徴があり、神経系のグリアおよび腎臓のメサンジウム細胞に特異的に発現していた。CalDAG-GEFIIIをPC12細胞に発現させると神経様突起を誘導し、Rasの活性化を引き起こしていることがわかった。

### 1. 研究目的

RasファミリーG蛋白の活性を制御する薬剤開発のために、RasファミリーG蛋白活性化因子の網羅的解析を行っている。さまざまな活性化因子を解析し、これらの活性を調節する薬剤開発を進める。

### 2. 研究方法

#### ① プラスミド

pBluescript-SKII-(+)-KIAA0846はかずさDNA研究所より供与いただいた。このcDNAを発現ベクターpCAGGSに導入し、pCXN2-Flag-CalDAG-GEFIIIを得た。CalDAG-GEFIおよびCalDAG-GEFIIのcDNAをマウスcDNAライブラリーよりPCRにて増幅し、同様に発現ベクターを作成した。CalDAG-GEF間のキメラcDNAもPCRを用い、定法に従って作成した。また、CalDAG-GEFの触媒領域をPCRにて増幅し、大腸菌発現ベクターpGEXに導入し、蛋白を精製した。

#### ② 細胞培養およびトランスフェクション

293T細胞とrat1A細胞はダルベッコ変法イーグル培地(日水)に10%血清を加えたもので培養し、PC12細胞はさらに馬血清を5%加えたものを使用した。DNAはリン酸カルシウム法、FuGene6、あるいはLipofectamine2000を用いてトランスフェクトした。

#### ③ 抗体

抗Rap1抗体、抗Ras抗体、抗Flag M2モノクローナル抗体はそれぞれSantaCruz、Calbiochem、Sigma社より購入した。

#### ④ In situ hybridization

pBluescript SKII (+)-CalDAG-GEFを鋳型にジゴキシゲニンRNA標識キットを用いて、標識プローブを作成した。B6マウスの脳を液体窒素で急速凍結し、6 μmの厚さの切片を作成し、4%ホルムアルデヒドで固定した後、定法に従いプローブとハイブリダイズさせ、結合したプローブはアルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いて検出した。

#### ⑤ ERKおよびJNKアッセー

ERKおよびJNKのアッセーは、GSTタグをつけたERKおよびJNKを、CalDAG-GEFIIIとともに293T細胞で発現させ、この蛋白をグルタチオンビーズにて回収する。ついで、32P-γATPとその基質であるMBPあるいはJunを加えることにより、それぞれのリン酸化キナーゼ活性を調べる。

## ⑥ PC12細胞の分化

PC12細胞にCalDAG-GEFを発現するベクターをトランスフェクトし、48時間後に神経突起の伸長を調べた。

## ⑦ Rat-1A細胞の癌化

Rat-1A細胞にCalDAG-GEFを発現するベクターとトランスフェクトし、G418で選択する。10日後にクローニングし、細胞株を樹立する。いっぽう、一部はそのまま、すべてのコロニーを回収した。これらの細胞の軟寒天中での増殖を調べた。

## ⑧ G蛋白に結合するグアニンヌクレオチドの解析

R-Ras、TC21、およびM-Rasに結合するグアニンヌクレオチドの解析は主任研究者らが報告した方法によった。293T細胞にGSTタグのついたR-Ras、TC21、およびM-Rasをグアニンヌクレオチド交換因子の存在下および非存在下に発現させる。24時間後に、細胞を<sup>32</sup>P標識正リン酸でラベルする。細胞を可溶化したのちGSTタグをつけたG蛋白をグルタチオンビーズを用いて回収する。ビーズに結合したグアニンヌクレオチドはTLCにて分離し、BAS-1000イメージアナライザ(フジフィルム)を用いて定量した。

## ⑨ GTP結合型G蛋白の検出

GTP結合型G蛋白の検出はBosの方法によった。293T細胞に発現ベクターを導入する。ついで、細胞を溶解液(50 mM Tris、pH 7.5、150 mM NaCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1% NP-40、0.5% デオキシ胆汁酸、0.1% SDS、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)で溶解し、遠心して上清をとり、ここにGST-RalGDS-RBDあるいはGST-Raf-RBD+CRDをグルタチオンビーズに入れて4度で1時間反応させる。ビーズを洗浄した後、SDSサンプルバッファーに溶かす。これをSDS-PAGEの後、イムノブロットングで解析する。抗原は抗Flag抗体でECL化学発光法キットと、LAS 1000イメージアナライザを用いて検出した。

## ⑩ 試験管内グアニンヌクレオチド交換反応

GDP蛍光アナログである2',3'-bis(O)-(N-methylanthranolol)-guanosine-diphosphate (mGDP)は同仁化学に依頼して作成してもらった。His-R-Ras、His-TC21、およびHis-M-RasにmGDPをロードする方法は昨年報告したRap1と同様である。mGDP標識効率はR-Rasが50から60%、TC21とM-Rasでは80から90%であった。グアニンヌクレオチド交換活性の測定には400 nMの標識したG蛋白を100 nMのグアニンヌクレオチド交換因子と反応バッファー(50 mM Tris-HCl、pH 7.5、5 mM MgCl<sub>2</sub>、and 2 mM DTT)中で反応させる。反応はGTPを200 μMの濃度に添加することで開始した。蛍光の変化はJASCO FP-750蛍光分光光度計にて、励起波長366 nmおよび蛍光波長450 nmにて測定した。

## 3. 研究成果

### ① CalDAG-GEFIIIの同定

われわれは、RasファミリーG蛋白のグアニンヌクレオチド交換因子の網羅的解析を行うために、データベースサーチを日常的に行っている。その過程でKIAA0846がわれわれの報告したCalDAG-GEFIと近縁の蛋白として発見された。そこで、これをCalDAG-GEFIIIと命名した。

### ② CalDAG-GEFIIIの分布

CalDAG-GEFIIIはNorthern blottingの結果では、脳にしか発現を検出できなかった。さらに細胞特異的発現を調べるために、In situ hybridizationを行った。その結果、脳では主に白質のGFAP陰性グリア細胞に発現しており、オリゴデンドログリアに特異的であることが示唆された。一方、CalDAG-GEFIが被殻の神経細胞に、CalDAG-GEFIIが小脳プルキンエ細胞と海馬錐体細胞に特異的であった。腎臓においても同様の結果が得られた。すなわち、CalDAG-GEFIIIは腎系球体細胞に特異的に発現しているのに対し、CalDAG-GEFIは間質の細胞に、CalDAG-GEFIIは遠位尿細管に発現していた。これらの結果は、CalDAG-GEFの種類が細胞特異的であり、それが細胞のG蛋白の反応性を決定していることを示唆する。

### ③ ERKおよびJNKの活性化

CalDAG-GEFIIIの細胞内での意義を探るために、MAPキナーゼ群のERKおよびJNKの活性を他のCalDAG-GEFと比較した。ERKはCalDAG-GEFIIIがもっとも強く活性化し、CalDAG-GEFII

はそれに次いだ。CalDAG-GEFIでは活性化は明らかではなかった。一方、JNKの活性化はCalDAG-GEFIIがもっとも強く、CalDAG-GEFIIIはその次であった。しかし、CalDAG-GEFIによる活性化は軽微であった。

#### ④ CalDAG-GEFIIIによるPC12細胞の分化誘導

PC12細胞の分化はRasファミリーG蛋白により制御されていることが知られている。そこでPC12細胞にCalDAG-GEFを導入した。ここで用いたCalDAG-GEFは活性化するためにCAAXボックスを付加したものである。CalDAG-GEFIIによるPC12細胞の分化は細く長い神経突起で、Rasによる典型的な分化に非常に類似していた。一方、CalDAG-GEFIIIもPC12細胞の分化を誘導したが、神経突起の幅が広く、Rasによる分化とは形態がやや異なっていた。CalDAG-GEFIではPC12細胞の分化は誘導できなかつた。

#### ⑤ CalDAG-GEFIIIによる細胞の癌化

次に、Rat-1A細胞を用いて、試験管内での癌化誘導能を比較した。まず、CalDAG-GEFの発現ベクターをRat-1A細胞に導入し、これらを軟寒天にまき、足場非依存性の増殖能を調べた。その結果、CalDAG-GEFIIがもっとも強い癌化能を有し、CalDAG-GEFIIIがこれに次ぎ、CalDAG-GEFIには癌化能はないことがわかった。次に、これらを発現する細胞株を樹立し、ほぼ同等の発現レベルを有する細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いて同様の実験を行ったところ、CalDAG-GEFIIIを発現する細胞株はCalDAG-GEFIIを発現する細胞株と比較すると癌化能がかなり低いことがわかった。RasおよびRap1の活性化の程度をこれらの細胞株で調べたところ、CalDAG-GEFIIIを発現する細胞では、RasもRap1も活性化されているのに対し、CalDAG-GEFIIを発現する細胞ではRasのみが活性化されていることがわかった。このことは、CalDAG-GEFIII発現細胞におけるRap1の活性化はRasによる癌化能を抑制していることを示唆している。

#### ⑥ CalDAG-GEFの293細胞内での基質特異性

まず、CalDAG-GEFが293T細胞でどのRasファミリーG蛋白を活性化するかを調べた。GSTタグをつけたG蛋白とグアニンヌクレオチド交換因子とを発現する293T細胞を<sup>32</sup>P標識正リン酸で標識した後、G蛋白に結合しているグアニンヌクレオチドを解析した。その結果、CalDAG-GEFIは、R-Ras、Rap1A、Rap2Aを活性化した。CalDAG-GEFIIは、H-Ras、R-Rasを活性化した。CalDAG-GEFIIIは、H-Ras、R-Ras、Rap1A、Rap2Aを活性化したがRap1Aは活性化できなかつた。これら基質特異性が、制御領域と触媒領域のどちらにより決定されているかを調べるために、CalDAG-GEFIとCalDAG-GEFIIのキメラ分子を作成し解析した。その結果、基質特異性は触媒領域にのみ依存していることが明らかとなった。

#### ⑦ 試験管内でのグアニンヌクレオチド交換反応

CalDAG-GEFによるグアニンヌクレオチド交換反応を試験管内で解析した。CalDAG-GEFファミリーの触媒領域を大腸菌で精製した後を用いた。ここに蛍光標識GDPアナログであるmGDPとG蛋白を加え、GTPとの交換を調べた。H-RasはCalDAG-GEFIIIによりもっとも強く活性化され、ついでCalDAG-GEFIIにより活性化された。CalDAG-GEFIにはH-Ras活性化能はなかつた。Rap1AはCalDAG-GEFIによりもっとも強く活性化され、ついでCalDAG-GEFIIIにより活性化された。CalDAG-GEFIIにはRap1A活性化能は無かつた。R-RasはCalDAG-GEFIIIによりもっとも強く活性化され、ついで、CalDAG-GEFII、CalDAG-GEFIの順番に活性化された。

## 4. 考 察

CalDAG-GEFIIIは、カルシウムと脂質により制御されるグアニンヌクレオチド交換因子の3番目のものである。Northernブロットングではいずれも脳組織に多く発現されていたが、in situ hybridizationの結果より、これらのCalDAG-GEFは重複することなく、特異的な細胞に発現していることがわかった。CalDAG-GEFIIIは、ほかのCalDAG-GEFIやIIとことなりオリゴデンドログリアでしか発現しておらず、この細胞での特異的な機能をになっていることが示唆された。また、腎臓においても同様で、このCalDAG-GEFIIIは腎糸球体に特異的に発現しており、この細胞での機能に関わっているらしい。

一方、CalDAG-GEFIIIは、分担研究者の前川らの報告にあるように、Ras、Rap1、R-Rasの3つのサブファミリーのG蛋白を活性化することができるいわば汎Ras活性化因子である。これらのGEFは普遍的に存在するので、おそらく、CalDAG-GEFIIIが発現する細胞においても発現しているものと考えている。そこで、この広い基質特異性の意義を調べた。RasとRap1がRas-MAPK系

において競合阻害することが知られているが、少なくとも293T細胞を用いた系では、MAPKの活性化はCa1DAG-GEFIIIにおいて最も強く、このモデルは当てはまらないと思われる。しかし、PC12細胞の分化や、Rat1A細胞の癌化を検討したところ、Ca1DAG-GEFIIIはCa1DAG-GEFIIよりも活性が弱く、Ca1DAG-GEFIIIによるRap1の活性化はRas依存性の分化や癌化には抑制的に働くことが示された。

Rasと比較すると、Rap1やR-Rasの生理機能に関する研究は著しく遅れている。例えば本研究で示したように、Rap1がRasの活性を抑制することが本来の機能であるのかについてはこれからの研究を待つ状況である。

## 5. 結 論

Ca1DAG-GEFIIIという新しいRas癌遺伝子産物の活性化因子の解析を行い、この因子が汎Ras活性化因子としての性質を有していることを見出した。

## 6. 研究発表

1. Mochizuki, N., Y. Ohba, S. Kobayashi, N. Otsuka, A. M. Graybiel, and M. Matsuda. 2000. Crk Activation of JNK via C3G and R-Ras. *J.Biol.Chem.* **275**:12667-12671.
2. Ohba, Y., N. Mochizuki, K. Matsuo, S. Yamashita, M. Nakaya, Y. Hashimoto, M. Hamaguchi, T. Kurata, K. Nagashima, and M. Matsuda. 2000. Rap2 as a slowly responding molecular switch in the Rap1 signaling cascade. *Mol.Cell.Biol.* **20**:6074-6083.
3. Ohba, Y., N. Mochizuki, S. Yamashita, A. M. Chan, J. W. Schrader, S. Hattori, K. Nagashima, and M. Matsuda. 2000. Regulatory proteins of R-ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-ras3. *J.Biol.Chem.* **275**:20020-20026.
4. Yamashita, S., N. Mochizuki, Y. Ohba, M. Tobiume, Y. Okada, H. Sawa, K. Nagashima, and M. Matsuda. 2000. Ca1DAG-GEFIII activation of Ras, R-Ras, and Rap1. *J.Biol.Chem.* **275**:25488-25493.
5. Kobayashi, S., T. Shirai, E. Kiyokawa, N. Mochizuki, M. Matsuda, and Y. Fukui. Membrane recruitment of DOCK180 by binding to PtdIns(3,4,5,)P<sub>3</sub> *Biochem.J.*, in press.

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社