

動脈硬化症における低分子量 GTP 結合蛋白質制御因子の役割の解明

主任研究者 望月直樹 国立循環器病センター研究所循環器形態部 部長

研究要旨: ゲノムのアノテーションにより、多くの分子に G 蛋白の活性を制御する機能が予想されているが、それらを実際に検証するには、より自動化されたシステムが必要である。本研究では、Rho ファミリー G 蛋白の Rac および Cdc42 の活性を生細胞でモニターする分子を作成し、それを用いて、これらの制御因子の活性を高速に検索するシステムを構築した。さらに、この系の有用性を検証するために、cDNA プロジェクトにより単離された 6 つの Rho ファミリー G 蛋白に対する制御因子の基質特異性を調べた。血管内皮細胞を用いて Ras ファミリー GTP 結合蛋白質の GTP/GDP 交換因子(GEF)と GTPase 活性化因子(GAP)の活性化を可視化を行なった。これは FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer)理論を応用したプローブを細胞内に導入することで、刺激依存性に FRET の増減を観察することで達成された。動脈硬化に関連することが注目を集めている guanine-nucleotide exchange factor (GEF)の family の mouse 臓器における発現を *in situ* hybridization (ISH)で比較検討した。その結果マウス胎児における発現分布は CalDAG 群が各々に固有の細胞・組織特異性を示したのに対し、Sos、C3G は ubiquitous であった。

分担研究者 松田道行
大阪大学微生物病研究所
腫瘍ウイルス分野教授

澤 洋文
北海道大学医学研究科
分子細胞病理助教授

A. 研究目的

動脈硬化症における Ras ファミリー GTP 結合蛋白質の GEF・GAP の調節機構を調べるためには①ゲノム情報から得られる新規 GEF・GAP を同定し、その基質特異性を決定していくこと②その機能を細胞・個体で検討することが重要である。機能の新たな評価方法として FRET を用いた GEF/GAP の活性化のモニターングを行なうべく、Ras、Rap1、R-Ras 分子の可視化プローブの開発をおこなう。さらに同プローブを用いて循環調節因子刺激による GEF/GAP の活性化を調べる。

ゲノムのアミノ酸配列を比較することにより、多くの蛋白の機能ドメインが同定され、特に、G 蛋白の活性制御因子が非常に多数存在することが明らかになってきた。しかし、現在のアミノ酸構造比較のレベルでは、基質特異性の予測は非常に不正確である。すなわち、Ras ファミリー、Rho ファミリー等の活性制御因子であることは予測できても、その中のどの分子に対して活性を有しているのかまでは予測できない。一方、G 蛋白の制御因子の基質特異性は依然として、生化学的手法に依っているが、多くの活性制御因子群を蛋白レベルで調整するのは事実上不可能に近い。そこで、本研究では、活性制御因子群の cDNA を直接細胞に発現させ、その生細胞でどの G 蛋白に対して作用するのかを調べるといふ新しい手法を開発する。

B. 研究方法**G 蛋白活性制御因子群の網羅的基質特異性の決定**

プラスミド pRaichu-Ras と pRaichu-Rap1 については既に報告した。pRaichu-Rac と pRaichu-Cdc42 の作成は、pRaichu-Ras と同様に作成した。Raichu-Rac はアミノ末端から順に、YFP、スペーサー、PAK1 の CRIB 領域、スペーサー、Rac1、スペーサー、CFP、スペーサー、Ki-Ras の CAAX ボックスから成る。Raichu-Cdc42 は上記の Rac1 の部位が Cdc42 に置換されている。接尾語に用いた-V12 と-N17 は、それぞれ Rac1 あるいは Cdc42 の Gly12 と Thr17 が Val と Ala に置換されている組み換え蛋白質の表記に用いた。

pRaichu-CRIB は pRaichu-Rac から Rac1 コード配列を削除して作成した。KIAA0053、KIAA0362、KIAA0793、KIAA1204、KIAA1256、KIAA1391 の cDNA は Kazusa DNA Institute (Kisarazu, Japan) から供与された。dsFP593 (6) は宮脇博士 (理研) から頂いた。pIRM21 は pCAGGS に由来する発現ベクターであり、3' 側のマルチクローニング部位に internal ribosomal entry site と dsFP593 の翻訳領域が含まれている。一連の KIAA 由来蛋白質の翻訳配列は pIRM21 のクローニング部位にサブクローニングされている。pCAGGS-mSos、pCAGGS-RasGRF1、pCAGGS-DOCK180 は既に記載されているものを用いた。pSRneo-myc-RhoGDI、pSR α -Vav、pcDNA3-HA-Tiam1 (C1199) は、高井義美博士(大阪大学)、真野博之博士(自治医科大学)、J. Collard (Netherlands Cancer Institute) からそれぞれ頂いた。pCXN2-Flag-Rac と pCXN2-Flag-Cdc42 は、それぞれ Flag タグ付ヒト Rac1 と Flag タグ付ヒト Cdc42 の翻訳領域が真核生物の発現ベクター pCXN2-Flag にサブクローニングされている。

96 ウェルプレートを用いた GEF 活性と GAP 活性の解析: COS-1 細胞をコラーゲンコートしたガラス底の 96 ウェルプレート (アサヒテクノグラス)に播き、各ウェルの細胞に 50 ng の pRaichu-Rac もしくは pRaichu-Cdc42 と GEF または GAP をコードした発現ベクター 100 ng を組み合わせ、Polyfect (Qiagen)を用いてトランスフェクションした。8 ウェルに同一組のプラスミドをトランスフェクションしてサンプルに用いた。24 時間後、無血清 MEM 培地に交換し、さらに 6 時間培養して速やかにイメージングを行った。Metamorph の auto-threshold 機能を用いて、1 視野から常に 30 個以上の細胞の FRET 画像を取得した。各細胞の面積値と蛍光強度はバックグラウンドを引いた後に保存し、エクセル (Microsoft) を用いてさらに解析を進めた。連続した五段階の操作をエクセルプログラム上で作動するマクロを組み、自動化して処理した。まず、細胞の残骸や凝集した細胞を面積値で分け、データーから自動的に排除した。第 2 に、各細胞の蛍光強度 YFP/CFP のレシオを計算した。第 3 に、各ウェルの YFP/CFP 値の平均値を計算した。第 4 に、同一組のプラスミドをトランスフェクションした 8 ウェルの各 YFP/CFP 値から平均値と標準偏差値を算出した。最後に、これらのデータを棒グラフにして表示した。

G 蛋白質可視化の研究

(1) Ras ファミリーの GEF・GAP の機能を可視化するプローブの開発
すでに Ras、Rap1、R-Ras の活性化のプローブは開発済みである。Yellow-emitter Fluorescent Protein, Ras,

Raf-RBD (Ras binding domain), Cyan-emitted Fluorescent Protein に膜移行シグナルを付加したプローブをコードする DNA を哺乳動物細胞での発現ベクターに挿入した。これは Raichu (Ras and interacting chimeric unit) と命名し Ras 部分と Raf 部分を変更することで Ras, Rap1, R-Ras のそれぞれの活性化つまり GEF/GAP 活性を可視化できる プローブを作製する。

(2) 血管内皮細胞での Raichu プローブを用いた Ras ファミリー GTP 結合蛋白質の可視化
内皮細胞はヒト大動脈内皮細胞を Cascade Biologics 社から購入・Humedia (クラボウ) で培養した。同細胞に Raichu-Ras, raichu-Rap1 を LipofectAMINE (Invitrogen) で導入した。血清飢餓 8h 後に Eph チロシンキナーゼ受容体のリガンドである ephrin で刺激し、Ras, Rap1 の活性化を調べた。

(3) Raichu-Ras, Rap-1, R-Ras を高効率で導入するためのアデノウイルス Raichu の開発
Raichu をコードする DNA を pShuttle ベクターに挿入しその後制限酵素で切り出し pAdeno-X に入れ替えることアデノウイルスを作製した。これはクリンテック社の構築システムに則り作製を試みた。

(4) 血管内皮細胞遊走機構における Rap1 の機能の検討
Rap1 の GAP である rap1GAP1I と internal ribosomal entry site (IRES) の下流で GFP を発現する DNA をコードする発現ベクター pCXN2-rap1GAP1I-IRES-EGFP を作製して、rap1GAP1I 発現による内皮細胞遊走機能における役割を調べた。

GEF の組織における発現の検討

1) 対象：動物実験は北海道大学医学部実験動物倫理規定に則って行なった。マウスは 8 週齢の雌 C57BL/6CrSlc mouse または胎齢 14 日の胎仔を用いた。各臓器および胎仔は摘出後速やかに生理食塩水で洗浄し、TissueTek に包埋して液体窒素で凍結後、-80℃ に保存した。

2) *In situ* hybridization (ISH) :

i) RNA probe の作製

各々の CalDAG cDNA の coding region の一部を pBluescriptII SK⁺へ subcloning した。この vector をそれぞれ制限酵素で消化した後精製して linearized template を作製した。その後 T3, T7 RNA polymerase, DIG RNA labeling mixture を混合して 37℃, 60 分加温後、transcriptional reaction の結果を電気泳動で確認し、tRNA, RNase free DNase を加え、37℃ で 10 分反応させ、エタノール沈殿を施行し、25 μl の DEPC/DW に溶解した。

ii) DIG label-RNA probe による ISH

凍結包埋材料を 6 μm に薄切りし、風乾した後に 4% paraformaldehyde 処理を 15 分、無水酢酸による acetylation を施行し、prehybridization (50% formamide, 5 X SSC, 5 X Denhardt's solution, 500 μg/ml tRNA) を室温で 6 時間以上行った。その後、denature した DIG-labeled RNA probe を 200 ng/ml 含んだ hybridization buffer にて 70℃ で over night incubation した。翌日、切片を洗浄した後、抗 DIG 抗体を反応させ、NBT, X-phosphate にて発色させ観察した。

C. 研究結果

96 ウェルプレートでの Raichu-Rac と Raichu-Cdc42 を利用した GEF と GAP の解析：我々は Raichu-Rac と Raichu-Cdc42 を利用して、GEF 活性と GAP 活性測定のための迅速かつ簡便な細胞アッセイ系を立ち上げた。293T 細胞において、CAAX を外したプローブは CAAX 付のプローブより大量に発現させられるため、目的に合わせる Raichu-Rac と Raichu-Cdc42 から CAAX box を排除した。我々のアッセイ系の有用性を調べるために、Kazusa DNA Institute の HUGE cDNA ライブラリーから Rho ファミリー G 蛋白に対する GEF と GAP であることが予想

されている 6 つの cDNA を入手し、その活性を調べた。対照として Db1 ホモロジドメインをもつ Tiam-1, DOCK180, Vav, Ras-GRF1, mSos-1 を用いた。ガラス底の 96 ウェルプレートに播いた COS-1 細胞に、各 cDNA を CAAX を外した pRaichu-Rac または pRaichu-Cdc42 と共に、共発現させた。Raichu-Rac のレシオ値は Tiam-1 と DOCK180 の存在下では顕著に増加し、Vav と KIAA0362 存在下では若干増加を示した。したがって、これらの蛋白質は Rac に対し GEF 活性を有することが示された。Rac に対する GAP 活性は KIAA0053 でのみ検出された。Cdc42 に対する GEF 活性は KIAA0362 と KIAA1256 で、GAP 活性は KIAA0753 と KIAA1204 で検出された。このように、Raichu プローブを用いた簡便な方法で、推定上の GEF や GAP の特異性を調べることが可能となった。

G 蛋白質活性化の可視化

(1) Raichu プローブの細胞での発現の確認と、細胞内での full length 蛋白質の発現の確認を行なった。Raichu-ras, Raichu-Rap1, raichu-RRas とともに細胞での強制発現では YFP-Ras-rafRBD-CFP の全長に相当する 75 kDa の蛋白質を発現していた。

(2) Raichu-Ras を HAEC で発現して、Ras の活性化を行なった。Ephrin 刺激により Raichu の FRET は減少したことから、RasGAP の活性化あるいは Ras-GEF の抑制が起こっていることが示唆された。一方、Raichu-Rap1 を導入した HAEC では Ras の不活性化とは反対に細胞膜ラップリング部位で Rap1 の活性化が見られた。Ras の不活性化は 5 分を最下限にその後 FRET の増加・減少を繰り返しながら、徐々に回復する傾向が見られた。一方、Rap1 は同様に 5 分をピークにラップリングが観察可能な時間での活性化が継続した。

(3) アデノウイルス-Raichu の作製

HEK293 細胞に pAdeX-Raichu-Ras, Rap1, R-ras をそれぞれ感染させ、培養上清ならびに HEK293 細胞中のアデノウイルスを、freeze-thaw 法で回収した。感染効率を、HT1080, COS-1, NIH-3T3, HAEC, BAEC (牛大動脈血管内皮細胞), HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) を用いて検討した。血管内皮細胞ではいずれも高い効率で Raichu の発現を確認できた。さらに、HAEC 細胞に(2)と同様にアデノウイルスを用いて Raichu を導入し、ephrin 刺激による Ras, Rap1 の活性化を検討したところ、Ras では刺激依存性不活性化、Rap1 ではラップリング部位での活性化が同様に観察できた。

(4) HAEC 細胞での Rap1 の機能を調べるために、Rap1GAP1I を細胞に導入した。導入された細胞は EGFP を発現するために未導入細胞と、蛍光顕微鏡下で区別がつけられた。この細胞を ephrin で刺激した場合、未導入の細胞では顕著なラップリングを示すのに対して、rap1GAP1I 導入細胞では、ラップリングが抑制されていた。

組織での発現パターンの解析

CalDAG I, II は共に embryo で脳、下垂体、嗅上皮、喉頭、肝臓が、adult brain で嗅球、大脳皮質、視床、小脳のゴルジ細胞が、陽性となった。両者で異なっていたのは、CalDAG I で adult brain の四丘体、線条体、橋、延髄に発現が認められ、一方 CalDAG II では海馬、乳頭体、小脳のプルキンエ細胞が染まった点であった。embryo では CalDAG I は主に脳神経系が陽性となったが、その他に喉頭と肝臓の megakaryocyte が強陽性となった。この結果に基づいて、adult mouse の大腿骨骨髓で ISH を施行したところ、骨髓においても megakaryocyte の陽性が確認できた (data not shown)。一方 CalDAG II は神経系、喉頭、肝臓の他に脊椎と肺が陽性となった。大脳は、CalDAG I は神経上皮全体が染まったのに対し、CalDAG II は眼球に最も近い数層の神経上皮に局限していた。

CalDAG III は embryo では全身の大～中型血管周囲、大脳、下垂体が陽性となり、前二者のような臓器特異性は認められなかった。adult brain で大脳と小脳のグリア細胞

がびまん性に陽性となり、astrocyte のマーカーである GFAP および oligodendrocyte のマーカーである APC とそれぞれ二重染色を行った結果、ISH 陽性細胞は APC と重なり oligodendrocyte であることが明らかとなった。また

C3G、Sos は adult brain、embryo のどちらにおいても ubiquitous に染まり、embryo における臓器特異性、脳の部位・細胞特異性は認められなかった。

D. 考察

ポストゲノム時代の大きな課題は、DNA とは違い、ひとつひとつ異なる個性を持つ蛋白を、いかに同一の手法を出解析していくかという点である。本研究では G 蛋白の制御因子を例にとり、その回答を探っている。

まず、本研究で、最初に目標としてあげたのは、G 蛋白の活性化因子を蛋白として精製せずに、その活性を測定するという点である。これは、これまでの経験から、G 蛋白の活性制御因子は、100 kDa を越すものが多く、これを大腸菌で精製するのは非常に困難を伴うことが多かったからである。そこで、この問題をクリアするために、哺乳細胞に発現させることとした。また、これをより簡便に行えるように、KAZUSA cDNA ライブラリーの構築に用いられたのと同じ SalI と NotI の制限酵素をクローニングサイトとして有する哺乳細胞発現ベクターを作成した。さらに、トランスフェクション効率を、同時に解析するために、IRES の下流に蛍光蛋白 dsFP593 の cDNA を挿入した。

次に、生細胞で G 蛋白の活性制御を解析するために、Ras の活性化モニターとして作成した Raichu-Ras を改変した。このプローブは、CFP から YFP への FRET 効率が、Ras とその標的分子 Raf との結合により変化するように作られたものであるが、この Ras の部分を Rac あるいは Cdc42、Raf を Pak に置き換えた。試行錯誤の結果、Raichu-Ras とは異なり、Pak あるいは Cdc42 を N 末側に置いたときのみプローブとして使えることがわかった。

このプローブを用いることにより、3 つの GEF と想定された蛋白のうち、二つに GEF 活性を確認できた。また、3 つの GAP と想定された蛋白のうち二つに GAP 活性が認められた。コントロールとして用いた Sos が活性を示さなかったことからわかるように、GEF の活性は生細胞では負に制御されていることが多く、本アッセイ系がより生細胞を用いるという利点があるが、ここでは、負の制御を受ける、という欠点として現れている。今後、導入した蛋白の量をふやすなどして、活性をより簡便に測定するシステムの構築も必要となろう。今年度 Raichu プローブを用いて血管内皮細胞での ephrin 刺激による Ras、Rap1 の活性化を可視化することができた。これまで Ras ファミリー-GTP 結合蛋白質の GEF・GAP の検討は細胞の可溶化後に行なえる実験であったが、本法を用いることで生細胞での GEF/GAP 活性化を調べることが可能となった。可視化によって、時間的空間的な、GEF/GAP の活性化部位の違いも詳細に調べることによって Ras、Rap1 の活性化・不活性化が刺激依存性に違った部位で起きていることが明らかになった。とくに、内皮細胞での Raichu の導入にはアデノウイルスは不可欠であり、今後も種々のプローブの開発とともにアデノウイルスの開発も同時進行していくことが重要であると考えられた。現在共同研究者松田教授の研究室で開発中の Rho ファミリー分子の活性化モニターリングプローブを使用して、さらに内皮細胞での Rho 分子の機能について検討していくことが必要と考えられた。加えて、FRET を利用した活性化の可視化だけではなく、IRES により未導入・導入を区別して新たな GEF、GAP を導入した時の形態変化や刺激依存性におこる細胞の運動機能への影響などを詳細に検討していくことが重要であると考えた。

今回検索対象とした CalDAG I、CalDAG II、CalDAG III、Sos、C3G はいずれも GEF ファミリーに属するが、マウス脳および胎児における発現分布は CalDAG 群が各々に固有

の細胞・組織特異性を示したのに対し、Sos、C3G は ubiquitous であった。このことから、チロシキナーゼを介した低分子量 G 蛋白質の活性化機構は殆どの細胞でよく保存されているのに対し、カルシウム・ジアシルグリセロール刺激を引き金とする経路には組織・細胞特異性があり、それぞれの環境に適した GEF が選択的に発現していると考えられた。更に CalDAG 群の脳での発現は生後 8 週齢と胎齢 14 日目では必ずしも一致せず、脳の発生・成熟のある特定の時期において、何らかの機能を担っている可能性が考えられた。

今後これら GEF の基質である Ras family の発現分布を調べ両者の相関を検討することにより、低分子量 G タンパク質活性化の細胞特異性を検討すること、さらに心血管系に発現している事が予想される新規の GEF である KIA0915 についても同様な手法を用いて発現様式を調べ、動脈硬化モデル動物等を用いて、病態とその発現の関係を調べることを計画している。

E. 結論

G 蛋白の活性制御因子の基質特異性を簡便に測定する系を作成した。GEF/GAP の活性化を可視化するプローブ Raichu (Ras and Interacting Chimeric Unit) を作製して、これを血管内皮細胞に導入した。ephrin 刺激依存性の活性化をみたところ Ras の不活性化、Rap1 のラッピングでの活性化が観察された。GEF ファミリーに属する CalDAG 群は各々固有の細胞・組織特異性を示したのに対し、Sos、C3G は ubiquitous であった。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M. Distinct localization of the activated Rac and Cdc42 video-imaged by FRET-based single-molecule probes in a motile HT1080 cell. Submitted.
2. Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A, and Matsuda M. Spacio-temporal images of growth factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411: 1065-1068, 2001.
3. Ohba Y, Ikuta K, Ogura A, Matsuda J, Mochizuki N, Nagashima K, Kurokawa K, Bruce J. Mayer, Maki K, Miyazaki J, Matsuda M. Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *EMBO J* 20: 3333-3341, 2001.
4. Kurokawa K, Mochizuki N, Ohba Y, Mizuo H, Miyawaki A, Matsuda M. A Pair of Fluorescent Resonance Energy Transfer-based Probes for Tyrosine Phosphorylation of the Crkl Adaptor Protein in Vivo. *J Biol Chem* 276: 31305-31310, 2001.
5. Nagai M, Tanaka S, Tsuda M, Endo S, Kato H, Sonobe H, Minami A, Hiraga H, Nishihara H, Sawa H, Nagashima K: Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 3843-3848, 2001.
6. Zaman AK, Fujii S, Sawa H, Goto D, Ishimori N, Watano K, Kaneko T, Furumoto T, Sugawara T, Sakuma I, Kitabatake A, Sobel BE: Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates hypofibrinolysis and reduces cardiac perivascular fibrinolysis in genetically obese diabetic mice. *Circulation* 103: 3123-3128, 2001.
7. Shirane M, Sawa H, Kobayashi Y, Nakano T, Shinkai Y, Nagashima K, and Negishi I. Deficiency of phospholipase C-1 impairs renal development and hematopoiesis. *Development* 128: 5173-5180, 2001.
8. Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H,

Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N: Hydrocephalus, *situs inversus*, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase λ -deficient mice: Possible implications for the pathogenesis of immotile cilia syndrome. **Mol Cell Biol** (2002)(in press).

9. Tsuda, M., Tanaka, S., Sawa, H., Hanafusa, H., and Nagashima: Signalling adaptor protein v-Crk activates Rho and regulates cell motility in 3Y1 rat fibroblast cell line. **Cell Growth Diff** (2002)(in press).
10. Nishihara H., Tanaka, S, Tsuda M., Oikawa S, Maeda M, Shimizu M, Shimoyama H, Tanigami A, Sawa H., Nagashima K: Molecular and immunohistochemical analysis of adaptor protein Crk in human cancers. **Cancer Letter** (2002)(in press).

H. 知的所有権の出願・取得状況
該当無し

ゲノム情報から新規 GEF・GAP の同定に関する研究

主任研究者 望月直樹 国立循環器病センター研究所循環器形態部 部長

研究要旨：血管内皮細胞を用いて Ras ファミリー-GTP 結合蛋白質の GTP/GDP 交換因子(GEF)と GTPase 活性化因子(GAP)の活性化を可視化を行なった。これは FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer)理論を応用したプローブを細胞内に導入することで、刺激依存性に FRET の増減を観察することで達成された。

A. 研究目的

動脈硬化症における Ras ファミリー-GTP 結合蛋白質の GEF・GAP の調節機構を調べるためには①ゲノム情報から得られる新規 GEF・GAP を同定し、その基質特異性を決定していくこと②その機能を細胞・個体で検討することが重要である。機能の新たな評価方法として FRET を用いた GEF/GAP の活性化のモニタリングを行なうべく、Ras, Rap1, R-Ras 分子の可視化プローブの開発をおこなう。さらに同プローブを用いて循環調節因子刺激による GEF/GAP の活性化を調べる。

B. 研究方法

(1) Ras ファミリーの GEF・GAP の機能を可視化するプローブの開発

すでに Ras, Rap1, R-Ras の活性化のプローブは開発済みである。Yellow-emitter Fluorescent Protein, Ras, Raf-RBD (Ras binding domain), Cyan-emitted Fluorescent Protein に膜移行シグナルを付加したプローブをコードする DNA を哺乳動物細胞での発現ベクターに挿入した。これは Raichu (Ras and interacting chimeric unit) と命名し Ras 部分と Raf 部分を変更することで Ras, Rap1, R-Ras のそれぞれの活性化つまり GEF/GAP 活性を可視化できる プローブを作製する。

(2) 血管内皮細胞での Raichu プローブを用いた Ras ファミリー-GTP 結合蛋白質の可視化

内皮細胞はヒト大動脈内皮細胞を Cascade Biologics 社から購入・Humedia (クラボウ) で培養した。同細胞に Raichu-Ras, raichu-Rap1 を LipofectAMINE (Invitrogen) で導入した。血清飢餓 8h 後に Eph チロシンキナーゼ受容体のリガンドである ephrin で刺激し、Ras, Rap1 の活性化を調べた。

(3) Raichu-Ras, Rap-1, R-Ras を高効率で導入するためのアデノウイルス Raichu の開発

Raichu をコードする DNA を pShuttle ベクターに挿入しその後制限酵素で切り出し pAdeno-X に入れ替えることアデノウイルスを作製した。これはクリンテック社の構築システムに則り作製を試みた。

(4) 血管内皮細胞遊走機構における Rap1 の機能の検討

Rap1 の GAP である rap1GAPII と internal ribosomal entry site (IRES) の下流で GFP を発現する DNA をコードする発現ベクター-pCXN2-rap1GAPII-IRES-EGFP を作製して、rap1GAPII 発現による内皮細胞遊走機能における役割を調べた。

C. 研究結果

(1) Raichu プローブの細胞での発現の確認と、細胞内での full length 蛋白質の発現の確認を行なった。

Raichu-ras, Raichu-Rap1, raichu-RRas とともに細胞での強制発現では YFP-Ras-rafRBD-CFP の全長に相当する 75 kDa の蛋白質を発現していた。

(2) Raichu-Ras を HAEC で発現して、Ras の活性化を行なった。Ephrin 刺激により Raichu の FRET は減少したことから、RasGAP の活性化あるいは Ras-GEF の抑制が起こっていることが示唆された。一方、Raichu-Rap1 を導入した HAEC では Ras の不活性化とは反対に細胞膜ラップリング部位で Rap1 の活性化が見られた。Ras の不活性化は 5 分を最下限にその後 FRET の増加・減少を繰り返しながら、徐々に回復する傾向が見られた。一方、Rap1 は同様に 5 分をピークにラップリングが観察可能な時間での活性化が継続した。

(3) アデノウイルス-Raichu の作製

HEK293 細胞に pAdeX-Raichu-Ras, Rap1, R-ras をそれぞれ感染させ、培養上清ならびに HEK293 細胞中のアデノウイルスを、freeze-thaw 法で回収した。感染効率を、HT1080, COS-1, NIH-3T3, HAEC, BAEC(牛大動脈血管内皮細胞)、HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)を用いて検討した。血管内皮細胞ではいずれも高い効率で Raichu の発現を確認できた。さらに、HAEC 細胞に(2)と同様にアデノウイルスを用いて Raichu を導入し、ephrin 刺激による Ras, Rap1 の活性化を検討したところ、Ras では刺激依存性不活性化、Rap1 ではラップリング部位での活性化が同様に観察できた。

(4) HAEC 細胞での Rap1 の機能を調べるために、Rap1GAPII を細胞に導入した。導入された細胞は EGFP を発現するために未導入細胞と、蛍光顕微鏡下で区別がついた。この細胞を ephrin で刺激した場合、未導入の細胞では顕著なラップリングを示すのに対して、rap1GAPII 導入細胞では、ラップリングが抑制されていた。

D. 考察

今年度 Raichu プローブを用いて血管内皮細胞での ephrin 刺激による Ras, Rap1 の活性化を可視化することができた。これまで Ras ファミリー-GTP 結合蛋白質の GEF・GAP の検討は細胞の可溶化後に行なえる実験であったが、本法を用いることで生細胞での GEF/GAP 活性化を調べることが可能となった。可視化によって、時間的空間的な、GEF/GAP の活性化部位の違いも詳細に調べることによって Ras, Rap1 の活性化・不活性化が刺激依存性に違った部位で起きていることが明らかになった。とくに、内皮細胞での Raichu の導入にはアデノウイルスは不可欠であり、今後も種々のプローブの開発とともにアデノウイルスの開発も同時進行していくことが重要であると考えられた。現在共同研究者

松田教授の研究室で開発中の Rho ファミリー分子の活性化モニターリングプローブを使用して、さらに内皮細胞での Rho 分子の機能について検討していくことが必要と考えられた。加えて、FRET を利用した活性化の可視化だけではなく、IRES により未導入・導入を区別して新たな GEF, GAP を導入した時の形態変化や刺激依存性におこる細胞の運動機能への影響などを詳細に検討していくことが重要であると考えた。

E. 結論

GEF/GAP の活性化を可視化するプローブ Raichu (Ras and Interacting Chimeric Unit) を作製して、これを血管内皮細胞に導入した。ephrin 刺激依存性の活性化をみたところ Ras の不活性化、Rap1 のラップリングでの活性化が観察された。今後さらに Rho ファミリー蛋白質の活性化を検討できるプローブの開発と細胞内での機能の可視化を行なっていく予定である。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A, and Matsuda M. Spacio-temporal images of growth factor-induced activation of Ras and Rap1. **Nature** 411: 1065-1068, 2001.
2. Ohba Y, Ikuta K, Ogura A, Matsuda J, Mochizuki N, Nagashima K, Kurokawa K, Bruce J. Mayer, Maki K, Miyazaki J, Matsuda M. Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. **EMBO J** 20: 3333-3341, 2001.
3. Kurokawa K, Mochizuki N, Ohba Y, Mizuo H, Miyawaki A, Matsuda M. A Pair of Fluorescent Resonance Energy Transfer-based Probes for Tyrosine Phosphorylation of the Crkl1 Adaptor Protein in Vivo. **J Biol Chem** 276: 31305-31310, 2001.

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当無し

新規GEF・GAPの基質特異性の検討に関する研究

分担研究者 松田道行 大阪大学微生物病研究所腫瘍ウイルス分野 教授

研究要旨:ゲノムのアノテーションにより、多くの分子にG蛋白の活性を制御する機能が予想されているが、それらを実際に検証するには、より自動化されたシステムが必要である。本研究では、RhoファミリーG蛋白のRacおよびCdc42の活性を生細胞でモニターする分子を作成し、それを用いて、これらの制御因子の活性を高速に検索するシステムを構築した。さらに、この系の有用性を検証するために、cDNAプロジェクトにより単離された6つのRhoファミリーG蛋白に対する制御因子の基質特異性を調べた。

A. 研究目的

ゲノムのアミノ酸配列を比較することにより、多くの蛋白の機能ドメインが同定され、特に、G蛋白の活性制御因子が非常に多数存在することが明らかになってきた。しかし、現在のアミノ酸構造比較のレベルでは、基質特異性の予測は非常に不正確である。すなわち、Rasファミリー、Rhoファミリー等の活性制御因子であることは予測できても、その中のどの分子に対して活性を有しているのかまでは予測できない。一方、G蛋白の制御因子の基質特異性は依然として、生化学的手法に依っているが、多くの活性制御因子群を蛋白レベルで調整するのは事実上不可能に近い。そこで、当研究では、活性制御因子群のcDNAを直接細胞に発現させ、その生細胞でどのG蛋白に対して作用するのかを調べるという新しい手法を開発する。

B. 研究方法

プラスミド pRaichu-RasとpRaichu-Rap1については既に報告した。pRaichu-RacとpRaichu-Cdc42の作成は、pRaichu-Rasと同様に作成した。Raichu-Racはアミノ末端から順に、YFP、スペーサー、PAK1のCRIB領域、スペーサー、Rac1、スペーサー、CFP、スペーサー、Ki-RasのCAAXボックスから成る。Raichu-Cdc42は上記のRac1の部位がCdc42に置換されている。接尾語に用いた-V12と-N17は、それぞれRac1あるいはCdc42のGly12とThr17がValとAlaに置換されている組み換え蛋白質の表記に用いた。pRaichu-CRIBはpRaichu-RacからRac1コード配列を削除して作成した。KIAA0053、KIAA0362、KIAA0793、KIAA1204、KIAA1256、KIAA1391のcDNAはKazusa DNA Institute (Kisarazu, Japan) から供与された。dsFP593 (6)は宮脇博士 (理研) から頂いた。pIRM21はpCAGGSに由来する発現ベクターであり、3'側のマルチクロニング部位にinternal ribosomal entry siteとdsFP593の翻訳領域が含まれている。一連のKIAA由来蛋白質の翻訳配列はpIRM21のクロニング部位にサブクロニングされている。

pCAGGS-mSos、pCAGGS-RasGRF1、pCAGGS-DOCK180は既に記載されているものを用いた。

pSRneo-myc-RhoGDI、pSR α -Vav、pcDNA3-HA-Tiam1 (C1199)は、高井義美博士(大阪大学)、真野博之博士(自治医科大学)、J. Collard (Netherlands Cancer Institute) からそれぞれ頂いた。

pCXN2-Flag-RacとpCXN2-Flag-Cdc42は、それぞれFlagタグ付ヒトRac1とFlagタグ付ヒトCdc42の翻訳領域が真核生物の発現ベクターpCXN2-Flagにサブクロニングされている

96ウェルプレートを用いたGEF活性とGAP活性の解析: COS-1細胞をコラーゲンコートしたガラス底の96ウェルプレート(アサヒテクノグラス)に播き、各ウェルの細胞に50 ngのpRaichu-RacもしくはpRaichu-Cdc42とGEFまたはGAPをコードした発現ベクター100 ngを組み合わせ、Polyfect (Qiagen)を用いてトランスフェクションした。8ウェルに同一組のプラスミドをトランスフェクションしてサンプルに用いた。24時間後、無血清MEM培地に交換し、さらに6時間培養して速やかにイメージングを行った。Metamorphのauto-threshold機能を用いて、1視野から常に30個以上の細胞のFRET画像を取得した。各細胞の面積値と蛍光強度はバックグラウンドを引いた後に保存し、エクセル (Microsoft) を用いてさらに解析を進めた。連続した五段階の操作をエクセルプログラム上で作動するマクロを組み、自動化して処理した。まず、細胞の残骸や凝集した細胞を面積値で分け、データから自動的に排除した。第2に、各細胞の蛍光強度YFP/CFPのレシオを計算した。第3に、各ウェルのYFP/CFP値の平均値を計算した。第4に、同一組のプラスミドをトランスフェクションした8ウェルの各YFP/CFP値から平均値と標準偏差値を算出した。最後に、これらのデータを棒グラフにして表示した。

C. 研究結果

96ウェルプレートでのRaichu-RacとRaichu-Cdc42を利用したGEFとGAPの解析: 我々はRaichu-RacとRaichu-Cdc42を利用して、GEF活性とGAP活性測定

ための迅速かつ簡便な細胞アッセイ系を立ち上げた。293T細胞において、CAAXを外したプローブはCAAX付のプローブより大量に発現させられるため、目的に合わせてRaichu-RacとRaichu-Cdc42からCAAX boxを排除した。我々のアッセイ系の有用性を調べるために、Kazusa DNA InstituteのHUGE cDNAライブラリーからRhoファミリーG蛋白に対するGEFとGAPであることが予想されている6つのcDNAを入手し、その活性を調べた。対照としてDbl ホモロジドメインをもつTiam-1、DOCK180、Vav、Ras-GRF1、mSos-1を用いた。ガラス底の96ウェルプレートに播いたCOS-1細胞に、各cDNAをCAAXを外したpRaichu-RacまたはpRaichu-Cdc42と共に、共発現させた。Raichu-Racのレシオ値はTiam-1とDOCK180の存在下では顕著に増加し、VavとKIAA0362存在下では若干増加を示した。したがって、これらの蛋白質はRacに対しGEF活性を有することが示された。Racに対するGAP活性はKIAA0053でのみ検出された。Cdc42に対するGEF活性はKIAA0362とKIAA1256で、GAP活性はKIAA0753とKIAA1204で検出された。このように、Raichuプローブを用いた簡便な方法で、推定上のGEFやGAPの特異性を調べることが可能となった。

D. 考察

ポストゲノム時代の大きな課題は、DNAとは違い、ひとつひとつが異なる個性を持つ蛋白を、いかに同一の手法を出解析していくかという点である。本研究ではG蛋白の制御因子を例にとり、その回答を探っている。

まず、本研究で、最初に目標としてあげたのは、G蛋白の活性化因子を蛋白として精製せずに、その活性を測定するという点である。これは、これまでの経験から、G蛋白の活性制御因子は、100 kDaを越すものが多く、これを大腸菌で精製するのは非常に困難を伴うことが多かったからである。そこで、この問題をクリアするために、哺乳細胞に発現させることとした。また、これをより簡便に行えるように、KAZUSA cDNAライブラリーの構築に用いられたのと同じSalIとNotIの制限酵素をクローニングサイトとして有する哺乳細胞発現ベクターを作成した。さらに、トランスフェクション効率を、同時に解析するために、IRESの下流に蛍光蛋白dsFP593のcDNAを挿入した。

次に、生細胞でG蛋白の活性制御を解析するために、Rasの活性化モニターとして作成したRaichu-Rasを改変した。このプローブは、CFPからYFPへのFRET効率が、Rasとその標的分子Rafとの結合により変化するように作られたものであるが、このRasの部分にRacあるいはCdc42、RafをPakに置き換えた。試行錯誤の結果、Raichu-Rasとは異なり、PakあるいはCdc42をN末側に置いたときのみプロ

ーブとして使えることがわかった。

このプローブを用いることにより、3つのGEFと想定された蛋白のうち、二つにGEF活性を確認できた。また、3つのGAPと想定された蛋白のうち二つにGAP活性が認められた。コントロールとして用いたSosが活性を示さなかったことからわかるように、GEFの活性は生細胞では負に制御されていることが多く、本アッセイ系がより生細胞を用いるという利点があるが、ここでは、負の制御を受ける、という欠点として現れている。今後、導入した蛋白の量をふやすなどして、活性をより簡便に測定するシステムの構築も必要となろう。

E. 健康危険情報

なし。

F. 結論

G蛋白の活性制御因子の基質特異性を簡便に測定する系を作成した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M. Distinct localization of the activated Rac and Cdc42 video-imaged by FRET-based single-molecule probes in a motile HT1080 cell. Submitted.

2. 学会発表

伊藤玲奈、黒川量雄、大場雄介、吉崎尚良、松田道行: Racの生細胞モニター 第47回日本分子生物学会総会 横浜 平成13年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

新規 GEF・GAP の発現パターン解析に関する研究

分担研究者 澤 洋文 北海道大学医学研究科分子細胞病理 助教授

研究要旨：動脈硬化に関連することが注目を集めている guanine-nucleotide exchange factor (GEF)の family の mouse 臓器における発現を *in situ* hybridization (ISH)で比較検討した。その結果マウス胎児における発現分布は CalDAG 群が各々に固有の細胞・組織特異性を示したのに対し、Sos、C3G は ubiquitous であった。

A. 研究目的

guanine-nucleotide exchange factor (GEF)の細胞内情報伝達において、GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) は細胞表面にあるレセプターが受け取った細胞外刺激による情報を、細胞内において伝達、あるいは適切に変換するための分子スイッチとして働いている。G タンパク質は大きく分けて2つのタイプに分類することができる。ひとつはヘテロ三量体型 G タンパク質、もうひとつは癌遺伝子産物 Ras をはじめとする低分子量 G タンパク質である。

低分子量 G タンパク質は GDP に結合した不活性化型と GTP に結合した活性化型が存在するが、Sos、C3G、CalDAG-GEF I、II、III は GDP 結合型の低分子量 G タンパク質を GTP 結合型に変換するグアニンヌクレオチド交換因子(guanine-nucleotide exchange factor :GEF)に属する (図1)。

Sos や C3G は、チロシンキナーゼがアダプター分子を介してこれらを細胞膜に移行させることで低分子量 G タンパク質の活性化を誘導する。一方

CalDAG-GEF I、CalDAG-GEF II および CalDAG-GEF III はともに EF ハンドと C1 ドメインを有し、カルシウムとジアシルグリセロール刺激によってセカンドメッセンジャーに直接結合することで、低分子量 G タンパク質を活性化する。

CalDAG-GEF I、CalDAG-GEF II の基質はそれぞれ Rap1 と R-Ras、Ras と R-Ras であるが、CalDAG-GEF III はごく最近発見され、基質は未だ明らかでない。

以上の背景を基に本研究では Guanidine-nucleotide exchange factor (GEF) family (CalDAG-GEF I、II、III、Sos、C3G) の発現をマウス各臓器の凍結切片を用いた *in situ* hybridization (ISH) により比較検討を加えたのでここに報告する。

B. 研究方法

1) 対象：動物実験は北海道大学医学部実験動物倫理規定に則って行なった。マウスは8週齢の雌 C57BL/6CrSlc mouse または胎齢14日の胎仔を用いた。各臓器および胎仔は摘出後速やかに生理食塩水で洗浄し、TissueTek に包埋して液体窒素で凍結後、-80℃に保存した。

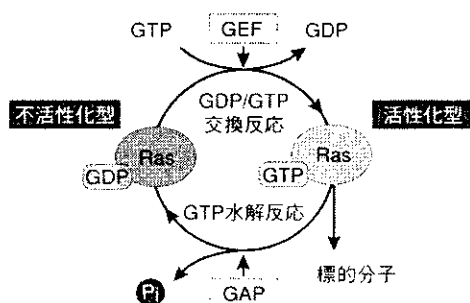


図1:低分子量Gタンパク質 (例 Ras) の活性化・不活性化サイクル。低分子量 G タンパク質は非刺激時には GDP に結合した不活性化型で存在するが、上流からの刺激により GEF が活性化されると GDP→GTP の交換が起こり活性化型となる。活性化型 G タンパク質は標的分子と結合しうる。活性化型 G タンパク質に結合した GTP は GTP 水解反応によって再び GDP に変換されるが、この反応には GTP 水解促進因子 (GAP) が関与している。

2) *In situ* hybridization (ISH) :

i) RNA probe の作製

各々の CalDAG cDNA の coding region の一部を pBluescriptII SK⁺へ subcloning した。この vector をそれぞれ制限酵素で消化した後精製して linearized template を作製した。その後 T3、T7 RNA polymerase、DIG RNA labeling mixture を混合して 37℃、60分加温後、transcriptional reaction の結果を電気泳動で確認し、tRNA、RNase free DNase を加え、37℃で10分反応させ、エタノール沈殿を施行し、25 μl の DEPC/DW に溶解した。

ii) DIG label-RNA probe による ISH

凍結包埋材料を 6 μm に薄切し、風乾した後に 4% paraformaldehyde 処理を 15 分、無水酢酸による acetylation を施行し、prehybridization (50% formamide, 5 X SSC, 5 X Denhardt's solution, 500 μg/ml tRNA) を室温で 6 時間以上行った。その後、denature した DIG-labeled RNA probe を 200 ng/ml 含んだ hybridization buffer にて 70℃で over night incubation した。翌日、切片を洗浄した後、抗 DIG 抗体を反応させ、NBT、X-phosphate にて発色させ観察した。

C. 研究結果

CalDAG I、II は共に embryo で大脳、下垂体、嗅上皮、喉頭、肝臓が、adult brain で嗅球、大脳皮質、視床、小脳のゴルジ細胞が、陽性となった。両者で異なっていたのは、CalDAG I で adult brain の四丘体、線条体、橋、延髄に発現が認められ、一方 CalDAG II では海馬、乳頭体、小脳のプルキンエ細胞が染まった点であった。embryo では CalDAG I は主に脳神経系が陽性となったが、その他に喉頭と肝臓の megakaryocyte が強陽性となった。この結果に基づいて、adult mouse の大腿骨骨髄で ISH を施行したところ、骨髄においても megakaryocyte の陽性が確認できた (data not shown)。一方 CalDAG II は神経系、喉頭、肝臓の他に脊椎と肺が陽性となった。大脳は、CalDAG I は神経上皮全体が染まったのに対し、CalDAG II は眼球に最も近い数層の神

経上皮に限局していた。

CalDAG III は embryo では全身の大～中型血管周囲、大脳、下垂体が陽性となり、前二者のような臓器特異性は認められなかった。adult brain で大脳と小脳のグリア細胞がびまん性に陽性となり、astrocyte のマーカーである GFAP および oligodendrocyte のマーカーである APC とそれぞれ二重染色を行った結果、ISH 陽性細胞は APC と重なり oligodendrocyte であることが明らかとなった。また

C3G、Sos は adult brain、embryo のどちらにおいても ubiquitous に染まり、embryo における臓器特異性、脳の部位・細胞特異性は認められなかった。

D. 考察

細胞は細胞膜上の受容体を介して外界からの様々な情報を核に伝達することで、増殖・分化・形態変化・アポトーシスなどの反応を示す。これらの情報伝達は最終的に MAPK、JNK、STAT 等が転写因子などを介して核内で標的遺伝子の転写を調節することに帰着するが、そのカスケードは非常に多様かつ複雑な経路をたどる。

今回検索対象とした CalDAG I、CalDAG II、CalDAG III、Sos、C3G はいずれも GEF ファミリーに属するが、マウス脳および胎児における発現分布は CalDAG 群が各々に固有の細胞・組織特異性を示したのに対し、Sos、C3G は ubiquitous であった。このことから、チロシンキナーゼを介した低分子量 G 蛋白質の活性化機構は殆どの細胞でよく保存されているのに対し、カルシウム・ジアシルグリセロール刺激を引き金とする経路には組織・細胞特異性があり、それぞれの環境に適した GEF が選択的に発現していると考えられた。更に CalDAG 群の脳での発現は生後 8 週齢と胎齢 14 日目では必ずしも一致せず、脳の発生・成熟のある特定の時期において、何らかの機能を担っている可能性が考えられた。

今後これら GEF の基質である Ras family の発現分布を調べ両者の相関を検討することにより、低分子量 G タンパク質活性化の細胞特異性を検討すること、さらに心血管系に発現している事が予想される新規の GEF である KIA0915 についても同様な手法を用いて発現様式を調べ、動脈硬化モデル動物等を用いて、病態とその発現の関係を調べることを計画している。

E. 結論

GEF ファミリーに属する CalDAG 群は各々固有の細胞・組織特異性を示したのに対し、Sos、C3G は ubiquitous であった。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. Nagai M, Tanaka S, Tsuda M, Endo S, Kato H, Sonobe H, Minami A, Hiraga H, Nishihara H, Sawa H, Nagashima K: Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 3843-3848, 2001
2. Zaman AK, Fujii S, Sawa H, Goto D, Ishimori N, Watano K, Kaneko T, Furumoto T, Sugawara T, Sakuma I, Kitabatake A, Sobel BE: Angiotensin-converting enzyme inhibition

attenuates hypofibrinolysis and reduces cardiac perivascular fibrinolysis in genetically obese diabetic mice. *Circulation* 103: 3123-3128, 2001.

3. Shirane M, Sawa H, Kobayashi Y, Nakano T, Shinkai Y, Nagashima K, and Negishi I. Deficiency of phospholipase C- γ 1 impairs renal development and hematopoiesis. *Development* 128: 5173-5180, 2001.
4. Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N: Hydrocephalus, situs inversus, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase λ -deficient mice: Possible implications for the pathogenesis of immotile cilia syndrome. *Mol Cell Biol* (2002)(in press).
5. Tsuda, M., Tanaka, S., Sawa, H., Hanafusa, H., and Nagashima: Signalling adaptor protein v-Crk activates Rho and regulates cell motility in 3Y1 rat fibroblast cell line. *Cell Growth Diff* (2002)(in press).
6. Nishihara H., Tanaka, S, Tsuda M., Oikawa S, Maeda M, Shimizu M, Shimoyama H, Tanigami A, Sawa H, Nagashima K: Molecular and immunohistochemical analysis of adaptor protein Crk in human cancers. *Cancer Letter* (2002)(in press).

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当無し