

平成13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

創薬のための生体機能解析に関する研究

細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および 抗癌剤の開発

所 属 国立感染症研究所感染病理部
研究者 松田 道行

分担研究者

高橋 秀宗 国立感染症研究所感染病理部
前川 隆司 シオノギ製薬 (株) 中央研究所

要 旨

細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤開発のための基盤研究を行った。RasファミリーG蛋白は、ウイルス感染、癌化、細胞分化、細胞死など多様な細胞機能を制御している。ゲノムプロジェクトにより多数のRasファミリー活性化因子あるいは不活性化因子ではないかという分子が同定されているが、生化学的手法は時間がかかるために、それらの活性の多くは未確認のままである。そこで、これらRasファミリーG蛋白の制御分子を網羅的に解析し、薬剤標的としての可能性を探るとともに、簡便なアッセイ系の開発を行った。さらに、HIVの複製過程に必要な情報伝達分子の検索を行った。

1. 研究目的

新規に開発したRasの活性を生きた細胞でリアルタイムに観察する技術を用いて、96ウェルプレートで迅速にRasファミリーG蛋白の活性化因子および不活性化因子の活性を測定する系を作成する。また、すでに報告したcAMP依存性Rap1活性化因子を改変して、cAMP依存性Ras活性化因子を作成する。さらに、HIVの感染を制御する情報伝達因子を標的とした薬剤開発の可能性を探る。

2. 研究方法

① Raichu二蛍光共鳴キメラ分子プローブ

pRaichu-RasとpRaichu-Rap1については既に報告した。pRaichu-Rhoは、pRaichu-Rasと同様に作成した。Raichu-Rhoはアミノ末端から順に、YFP、スペーサー、Rho結合蛋白、スペーサー、RhoA、スペーサー、CFP、スペーサー、Ki-RasのCAAXボックスから成る。Rho結合蛋白として用いたPKNのcDNAは小野博士に、mDia、Rhotekin、RhopilinのcDNAは成宮博士に供与いただいた。これらのcDNAのRhoA結合領域に相当する部分をPCRで増幅し、pCR-Topoにクローニングした。核酸配列を確認した後、プラスミド作成に用いた。接尾語に用いた-QLと-N17は、それぞれRhoAのGln63とThr19がLeuとAlaに置換されている組み換え蛋白質の表記に用いた。KIAA0053、KIAA0362、KIAA0380、KIAA0456、KIAA0793、KIAA1204、KIAA1256のcDNAはKazusa DNA Institute (Kisarazu, Japan) から供与された。dsFP593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-RasGRF1は既に記載されているものを用いた。P115RhoGEFおよびp50RhoGAPのcDNAは、Kozasa博士およびHall博士からそれぞれ頂いた。pCXN2-Flag-RhoAは、ヒトRhoA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。

② In vitroスペクトル測定における蛋白質の解析

プラスミドはリン酸カルシウム共沈法を用いて293T細胞にトランスフェクションした。36時間後、細胞を可溶化液 (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 5mM MgCl₂) で回収し、遠心して不溶物を除去した。蛍光スペクトルはFP-750 spectrofluorometer 蛍光分光光度計 (JASCO, Tokyo) を用い、励起波長433 nmで測定した。475 nmの蛍光をCFPの、530 nmの蛍光をYFPの蛍光とし、YFP/CFPの蛍光強度比をもって、FRET効率の指標とした。

③ 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-RhoA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。

④ cAMP依存性の活性化因子

RasファミリーG蛋白のプラスミドについてはすでに報告した。Epacの制御領域は、PCRによりcDNAライブラリーより増幅した。RasGRFの触媒領域のcDNAも同様に増幅した。これらをつなぎ合わせたcDNAを作成し、e-GRFと命名した。

⑤ 細胞培養およびトランスフェクション

293T細胞およびCOS 1細胞はダルベッコ変法イーグル培地に10%ウシ胎児血清を入れたもので培養した。発現プラスミドはリン酸カルシウム法にて293T細胞に、PolyfectにてCOS1細胞に導入した。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。24時間後に、細胞を100 μM Sp-cAMPSあるいは50 μM Forskolinと100 μM IBMXとで5分間刺激し、ついで、細胞を溶解液 (50 mM Tris、pH 7.5、150 mM NaCl、5 mM MgCl₂、1% NP-40、0.5% デオキシ胆汁酸、0.1% SDS、1mM Na₃VO₄) で溶解した。遠心して上清をとり、ここにGST-RaIGDS-RBD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、イムノブロッティングで解析する。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。

⑥ HIV-1の複製を制御する情報伝達分子

サルtopoisomerase Iのクローニングとシークエンスを行った。ついでヒトtopoisomerase Iのサイトダイレクトミュータゲネーシスによってサル型の配列に置換した種々のミュータントを作成した。さらに、サル細胞3種にtopoisomerase I発現プラスミドとnef部分にルシフェラーゼをコードするHIV-1プラスミドをトランスフェクトレウイルスを回収した。p24の抗原量で平均化したウイルスをCD4およびCXCR4を発現するHeLa細胞へ感染させ、48時間後のルシフェラーゼ活性を測定し、感染価とした。と同様にVSV-G蛋白を含むウイルスも作成し、ルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクションした細胞へアクチノマイシンDを加え毎2時間全RNAを抽出し、HIV-1 RNAの安定性をRT-PCRによって調べた。最後に、感染した細胞の逆転写されたDNAをPCRのより定量比較した。

3. 研究成果

① 新規蛍光プローブを用いたRasファミリー制御因子の網羅的解析法

われわれは、これまでにRasおよびRap1の活性をモニターする分子を作成している。本年度はこれをベースにRhoファミリーG蛋白の活性化モニターの作成を行った。モニターの構造はアミノ末側から、YFP、Rho結合蛋白、RhoA、およびCFP、CAAXボックスとなっている。RhoAの標的分子としては、RhopHlin、Rhotekin、mDia、PKNを用いて検討し、また、それぞれをN末あるいはC末側においたベクターを作成した。それぞれのベクターにおいて、RhoAの野生型と恒常的活性化型を用いて、RhoAのGTP/GDP比の変化がFRET効率の変化に対応するかを解析した。解析した組み合わせの中では、PKNをN末側においたものが、もっとも野生型と恒常的活性化型の間で活性に差が認められた。そこで、このプラスミドをpRaichu-RhoAとして以後用いることとした。次に、EF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、目的に合わせてRaichu-RhoA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Ras-GRF1とp115RhoGEFとを用いた。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-RhoAと、共発現させた。Raichu-RhoAのレシオ値はp115RhoGEF、KIAA0362、KIAA0380の存在下では顕著に増加した。したがって、これらの蛋白質はRhoAに対しGEF活性を有することが示された。RhoAに対するGAP活性はKIAA0053とp50RhoGAP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。

② cAMP依存性に活性をコントロールできるRap1に対するグアニンヌクレオチド交換因子の作成

Ras蛋白の機能を調べるためには、Ras蛋白の活性を簡便にコントロールするシステムが必要である。これまで知られているグアニンヌクレオチド交換因子は、293T細胞やCOS細胞に発現させると、それだけでRasの活性化を来し、GEF活性がどのように制御されているかを解析することはできなかった。一方、同じRasファミリーG蛋白の一つ、Rap1についても多くのグアニンヌクレオチド交換因子をこれまでの研究で解析してきたが、その多くは、Rasのグアニンヌクレオチド交換因子と同様に過剰発現のみで強い活性を有していた。しかし、cAMPで活性が制御されるEpacのみは、活性がcAMPに強く依存していた。この知見をもとに、EpacのC末端側の触媒領域を、Rasに対するグアニンヌクレオチド交換因子であるRasGRFのC末端側の触媒領域と置換した蛋白をデザインした。第一段階のPCRにて、EpacのN末側の制御領域とRasGRFの触媒領域を増幅し、第二段階のPCRにて、EpacのN末とRasGRFのC末が融合したものに相当するキメラ遺伝子を増幅した。このようにして作成されたキメラ蛋白をe-GRFと命名した。293T細胞で発現させたe-GRFは抗Flag抗体を用いるイムノプロットングにより予想されるサイズとして検出できた。さらに、Cos1細胞で発現させて、抗Flag抗体を用いる免疫染色を行った結果、細胞質に広く存在することがわかった。この分布はEpacの分布とほぼ同様である。293T細胞にe-GRFと、H-Ras、R-RasあるいはRap1を共発現させた。その上で、GTP結合型RasあるいはRap1の増加を調べた。その結果、e-GRFを発現している細胞ではcAMP依存性に、GTP結合型のH-RasおよびR-Rasの増加が見られたが、GTP結合型Rap1は増加しなかった。一方、Epacを発現している細胞では、すでに報告がある通り、cAMP依存性にRap1の活性が上昇したが、H-RasおよびRap1の活性は変化しなかった。

③ HIVの複製を制御する細胞内情報伝達因子

サルtopoisomerase Iはヒトと較べ6ヶ所のアミノ酸の相違があることが判明した。ヒトtopoisomerase Iへポイントミューテーションを挿入したベクターはサル細胞において全て同等にミュータント蛋白を発現した。サル細胞由来のウイルスの感染性の比較では、ヒトtopoisomerase I (HWT) の発現により、サルtopoisomerase I (SWT)またはベクターのみ (pcDNA) に比較して5倍程度に感染性が増加した。各ポイントミュータントのうちN末の236、237番目のアミノ酸 EN (ヒト型) をDS (サル型) に変えたミュータント (S4) だけがサル細胞由来HIV-1の感染性低下を回復することができなかった。ヒト細胞由来ウイルスでもサルtopoisomerase IまたはS4ミュータントの発現により、感染性が5分の1程度に低下した。VSV-G蛋白の共発現により作成したウイルスも以上と同様の傾向を

示した。ウイルス産生細胞においてRNAの安定性を調べた結果、各種topoisomerase Iの発現による変化は認められなかった。逆転写産物の定量においてもヒトtopoisomerase Iを発現したサル細胞由来のウイルスはサル型を発現したものに比べ、7-8倍のcDNAを感染細胞において認めた。

4. 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RhoAに、RafをPKNに置き換えた。試行錯誤の結果、Raichu-Rasとは異なり、RhoAをN末側に置いたときで、かつPKNを標的分子として用いた場合に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Dbl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、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。

RasファミリーG蛋白は、多彩な情報伝達系において分子スイッチとして機能している。この活性を制御しているのがグアニンヌクレオチド交換因子である。通常、グアニンヌクレオチド交換因子にはセカンドメッセンジャーにより制御されるドメインがあり、それを会してRasファミリーG蛋白を制御していることがわかっている。これまでの主任研究者らの研究などから、数多くのRasに対するグアニンヌクレオチド交換因子が同定されており、それらはカルシウム、ジアシルグリセロール、cAMP、あるいはリン酸化などにより酵素活性が調節することが示されている。しかし、実際に、試験管内あるいは細胞に発現させて、これらセカンドメッセンジャーで酵素活性をコントロールすることができるものはまれである。RasはG蛋白の中でも、細胞の癌化に密接に関与することが知られており、その酵素活性を細胞内で自在にコントロールすることができれば、Rasがどういう作用で細胞を癌化に導いているかについて重要な情報が得られると期待される。今回、Epacの酵素活性制御領域をRasの活性化因子であるRasGRFの制御領域と置き換えることで、cAMP依存性にRasの活性を上昇させる分子をはじめ作成できた。ただし、過剰発現だけでも、ある程度のH-RasおよびR-Rasの活性化が認められたので、完全にcAMPだけでOnとOffが制御できるわけではない。これは、Epacを発現している細胞でのRap1の活性化はcAMP刺激なしでは、ほとんど見られないことを考えると、制御領域による酵素活性の抑制がe-GRFではまだ不完全であることを示唆しており、今後、改良する必要がある。

サル細胞由来のHIV-1ウイルスの感染価が低くなるメカニズムを明らかにするためにウイルス産生細胞へヒトtopoisomerase Iとそのミュータントを発現させ解析を進めた。ウイルス産生細胞へヒトtopoisomerase Iを発現させることによって、ウイルス感染価が著明に上昇することが判明した。さらに解析を進めると236, 237番目のアミノ酸がヒト型であることが重要であることが判明した。VSV-G蛋白によってエントリーをバイパスさせてもこの傾向が変化しなかったこと、産生細胞でのゲノムRNAの安定性は影響を受けなかったこと、topoisomerase Iはウイルスに持ち込まれている報告などからtopoisomerase Iのウイルス複製への作用点はエントリー後から染色体への組み込みの間にあると考えられる。ウイルス因子とtopoisomerase Iの236, 237番アミノ酸部分で何らかの相互作用が

複製に不可欠であると考えられる。さらにこのミュータント topoisomerase I を発現する細胞由来の HIV-1 は逆転写産物の産生能が減少しているため逆転写において topoisomerase I が作用していると考えられた。

一方、ヒト細胞由来のウイルス感染価をサル topoisomerase I が低下させたことから、サル topoisomerase I がドミナントネガティブにはたらいっていることも推測される。

5. 結 論

RhoA の活性化モニターを作成し、RhoA の活性制御因子群の活性を生きた細胞で解析するための 96 ウェルを用いたアッセイ系を構築した。AMP により Ras に対するグアニンヌクレオチド酵素活性を示す e-GRF という蛋白の合成に成功した。サル細胞を使用して、HIV-1 複製に重要な宿主因子 topoisomerase I の作用点を大まかに解析し逆転写であることが判明した。さらに topoisomerase I のうち複製に重要なのは 236, 237 番目のアミノ酸であることが判明した。

6. 研究発表

1. Kobayashi, S., T. Shirai, E. Kiyokawa, N. Mochizuki, M. Matsuda, and Y. Fukui. 2001. Membrane recruitment of DOCK180 by binding to PtdIns(3,4,5)P₃. *Biochem. J.* 354: 73-78.
2. Kurokawa, K., N. Mochizuki, Y. Ohba, H. Mizuno, A. Miyawaki, and M. Matsuda. 2001. A pair of FRET-based probes for tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein in vivo. *J. Biol. Chem.* 276: 31305-31310.
3. Mochizuki, N., S. Yamashita, K. Kurokawa, Y. Ohba, T. Nagai, A. Miyawaki, and M. Matsuda. 2001. Spacio-temporal images of growth factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411: 1065-1068.
4. Ohba, Y., K. Ikuta, A. Ogura, J. Matsuda, N. Mochizuki, K. Nagashima, K. Kurokawa, B. J. Mayer, K. Maki, J. Miyazaki, and M. Matsuda. 2001. Requirement of C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *EMBO J.* 20: 3333-3341.
5. Okada, Y., S. Endo, H. Takahashi, H. Sawa, T. Umemura, and K. Nagashima. 2001. Distribution and function of JCV agnoprotein. *J. Neuro. Virol.* 7: 302-306.

平成13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

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10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