

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

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

要 旨

細胞内情報伝達系、特に低分子量G蛋白の関わる情報伝達系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。まず、RasファミリーおよびRhoファミリーG蛋白の活性を生きた細胞で観察するための分子プローブ群を作成した。これらのプローブを用いて、Ras、Rap1、Rho、Rac、Cdc42などの代表的G蛋白が上皮細胞増殖因子刺激において細胞内のどこで活性化されるかを明らかにした。さらに、これら分子プローブを用いて、機能未知の分子群からG蛋白の制御活性を測定する簡便なアッセイ系を樹立した。さらに、HIVの活性制御を司る情報伝達分子の検索を行った。

1. 研究目的

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。低分子量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。しかし、これまで低分子量G蛋白の活性は生化学的手法によってのみ研究され、その時間的空間的制御機構については多くの点が不明のまま残されている。一方、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、これらの問題点解決のために生細胞で低分子量G蛋白の活性を測定する系を作成し、低分子量G蛋白の活性を生きた細胞で観察するとともに、その制御分子を網羅的に解析するための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。

2. 研究方法

① Raichu二蛍光共鳴キメラ分子プローブ

2群のプローブを作成した。最初の群のプローブは、アミノ末端から順に、黄色蛍光蛋白(YFP)、スペーサー、G蛋白の標的蛋白、スペーサー、低分子量G蛋白、スペーサー、シアン色蛍光蛋白(CFP)、スペーサー、CAAXボックスとなっている。この群のプローブはプローブ内のG蛋白が細胞のグアニンヌクレオチド交換因子により活性化されGTP結合型になると、プローブ内の標的蛋白に結合し、CFPとYFPとが近傍に来てFRET効率が增強するようにデザインされている。なお、プローブ作成に当たっては、低分子量G蛋白とG蛋白の標的蛋白は順番を替えたものも用意し、もっとも感度のよいものを実験に用いた。このようにして作成したプローブはpRaichu-Ras, Rap1, RhoA, Rac1, Cdc42である。もう一つの群のプローブはアミノ末端から順に、黄色蛍光蛋白(YFP)、スペーサー、G蛋白の標的蛋白、スペーサー、シアン色蛍光蛋白(CFP)、スペーサーとなっている。この群のプローブは、内在性のG蛋白が活性化されてプローブに結合するとFRET効率が低下するようにデザインされている。このようにしてRac/Cdc42のプローブならびにRhoのプローブを作成した。

② In vitroスペクトル測定における蛋白質の解析

プローブをコードする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時間後に細胞を可溶化液 (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 分光装置付顕微鏡を用いたタンパク質の解析

プローブをコードするプラスミドをリポフェクション法によりCos1細胞にトランスフェクトし、分光装置 (SpectraPro150) 付倒立型蛍光顕微鏡で観察する。420 nmで励起した蛍光スペクトラムをWinSpec32を用いて解析し、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。

④ 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。

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-RalGDS-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

HIV-1のゲノムRNAは細胞内では安定性が高いことが知られている。ゲノムRNAを細胞内と発芽後の粒子から抽出し、状態を調べた。またゲノムRNAの安定性を通じ、複製に影響を及ぼすと考えられる宿主topoisomerase Iの作用を解析した。

3. 研究成果

① 低分子量GTP結合蛋白の活性を測定するための分子プローブ群の作成

低分子量G蛋白のモニターを作成した。作成したプローブはRas, Rap1, RhoA, Rac1, Cdc42に対するものである。これらを用いて細胞内でのG蛋白の活性が上皮細胞増殖因子の刺激でどのように変化するかを解析した。Rasは、上皮細胞増殖因子の刺激により、細胞辺縁部より速やかに活性化されることがわかった。その活性の低下は細胞に依存し、EGFを多く発現している細胞では緩やかであることがわかった。一方、Rasに相同性が高いRap1は、Rasとはまったく逆に、細胞内膜で活性が上昇することがわかった。興味深いことに、上皮細胞増殖因子によるRap1の活性化はモノダンシルカダベリン等により阻害され、エンドサイトーシスが必要であることがわかった。Rap1の活性化のタイミングはRasのそ

れとよく似ていた。一方、Rac1は非常に速やかに細胞膜にほぼ均一に活性が上昇した。細胞辺縁部のひだ状部で活性が高い傾向もあったがそれほど顕著ではなかった。また、Rac1の活性低下は5分以内におきて、これはひだ状部が止まるよりもかなりはやかった。Cdc42は、Rac1と類似のパターンを示したが、Rac1とは異なりひだ状部で活性が持続していた。上皮細胞増殖因子によるRhoAの活性はやや減少した。

② 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、ここで作成した分子プローブを用いて、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。我々のアッセイ系の有用性を調べるために、かずさDNA研究所の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。さらに同様の手法でRacおよびCdc42に対するGEF、さらにはGAPのスクリーニングも可能であることがわかった。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。

③ 細胞周期によるRhoファミリーG蛋白の活性変化

HeLa細胞およびRat1A細胞とを用いて細胞周期においてどのようにRhoファミリーG蛋白の活性が変化するかを解析した。まず、HeLa細胞においては、RhoAの活性は分裂前期に低下し始め、後期に最低になる。このRhoAの活性低下は細胞が球形化してくる状況とよく一致し、RhoAによるアクチン線維の剛性が減少してくることを反映していると考えられる。細胞質分裂の開始とともにRhoAの活性は辺縁部で増加し始め、細胞が完全に扁平化した時点でもとの活性に戻る。この傾向はRat1A細胞でもほぼ同様である。一方、Rac1の活性はRhoAと同様に分裂前期で減少し始めるが、RhoAよりやや遅く、分裂終期の初め頃、細胞質が完全に分離する頃に活性が最低となり、細胞が広がるにつれて活性が上昇していく。Cdc42のカルボキシル末端を付加したプローブは細胞内膜に多く発現しており、やはり分裂前期に活性が低下し始め、Rac1と同様の経過をたどる。

④ HIVの複製を制御する細胞内情報伝達因子

細胞由来のゲノムRNAから約9.7 kbの全長のmRNAを抽出することができた。対照的にウイルス粒子から得たゲノムRNAはホルムアルデヒドゲル中でスミアにしか検出することができなかった。gagのC末に近いp7の領域を合成したRNAはHIV-1 NCp7 RNA結合タンパクや、BSA、デタージェントの存在下に10ヶ所で著名に切断されることが判明した。RNase Iの切断に対し、感度が高いところと、低いところがあり、ヘアピンループ構造を形成していることが示唆された。再現させた切断はヘアピンループ構造の一本鎖上で生じていることがわかった。topoisomerase Iの野生株、ミュータント(Y723F, K532A)は同様にヘアピンループへ結合することが判明した。これらの結合はSDS処理やタンパク分解酵素(PK)で消失したため結合には共有結合を含まないことが判明した。またヘアピンループ状のより短いRNA(21nt)に対しても同様にtopoisomerase Iは結合することができた。再結合活性を有するミュータント(Y723F)は野生株と同様に再結合を行い、再結合活性を消失したミュータント(K532A)は再結合させることができなかった。RNAの再結合能を有する野生株、Y723Fを含むウイルスの感染価は再結合能を失ったミュータントR488Aおよび、K532Aを発現させた細胞由来のウイルス感染価の4倍程度の感染価を示した 図3。このことはウイルスへ取り込まれたtopoisomerase Iの再結合活性がHIV-1の切断したゲノムRNAの修復に必要であったことを示唆した。

4. 考 察

ポストゲノム時代の大きな課題は、DNAとは異なりひとつひとつが異なる個性を持つ蛋白を、いかに同一の手法で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、最初に目標としてあげたのは、G蛋白の活性制御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。また、ここ数年の研究により、蛋白の活性は情報伝達ネットワークの中で考えるべきものであり、試験管内で精製した蛋白を用いた系ではなかなか生命の本質に迫れないことがわかってきたからでもある。そこで、これらの問題をクリアするために、生きた哺乳細胞でG蛋白の活性を測定する分子プローブの樹立を試みた。多くの試行錯誤の結果、この2年間にRas, Rap1, Rac, Cdc42, Rhoといった主たる低分子量GTP結合蛋白の活性を生きた細胞で観察することに成功した。これらの成果がいずれも世界で初めてであることを考えればこれは非常な進歩と言えるが、依然として多くの労力を費やしてのみ新しいプローブができていることを考えると、今後、これらの蛍光プローブを用いる手法が発展するには一層の技術上のブレークスルーが必要と思われる。

これら蛍光プローブを用いて、生細胞でG蛋白の制御因子の活性をスクリーニングする系は、比較的容易に確立することができた。特に、非常に多くの数があると予想されているRhoファミリーG蛋白の制御因子の解析においては威力を発揮することがわかった。しかし、このプローブを用いてもアミノ酸配列上では活性化因子であるGEFと想定された蛋白のうち、約半分程度にしかGEF活性を確認できなかった。また、不活性化因子のGAPについても同様であった。これらのことは、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、本アッセイ系の生細胞を用いるという利点が、ここでは、細胞内ネットワークにより負の制御をも受ける、という弱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、不活性のものの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。

RNAのヘアピンループはtopoisomerase Iの認識し結合する構造でありHIV-1のRNAゲノムも同様に細胞内で認識、結合されていると考えられる。この結合がウイルス粒子中にtopoisomerase Iが取り込まれていく原因であると推測できる。ヘアピンループRNAのループ部分にあるCAまたUAのシーケンスは切断しやすく、topoisomerase Iの再結合活性により安定化されていると考えられる。発芽後のゲノムRNAには物理的、化学的に特に切断しやすい因子が加わることが推測され、topoisomerase Iによる再結合活性は標的細胞でのcDNA合成時に不可欠であると考えられた。本機構を標的とした阻害剤の選択はウイルス因子と宿主因子の相互作用を標的とする、耐性株の出現しにくい抗HIV-1剤開発へつながっていくと考える。

5. 結 論

低分子量GTP結合蛋白の活性化モニターを作成し、生きた細胞でG蛋白の活性を観察する手法を確立した。さらに、これらのモニター分子を用いて、G蛋白の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。このアッセイ系を用いて、機能が証明されていないGEFおよびGAPの活性を証明することができた。これらの系はゲノムプロジェクトによって同定されてくる分子群の機能を簡便に示すことができるだけでなく、薬剤スクリーニング系としても有用である。

6. 研究発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

5. Endo, A., K. Nagashima, H. Kurose, S. Mochizuki, M. Matsuda, and N. Mochizuki. 2002. Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. **J. Biol. Chem.** 277:23747-23754.
6. Itoh, R. E., K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki, and M. Matsuda. 2002. Activation of Rac and Cdc42 video-imaged by FRET-based single-molecule probes in the membrane of living cells. **Mol. Cell. Biol.** 22:6582-6591.
7. Nagashima, K., A. Endo, H. Ogita, A. Kawana, A. Yamagishi, A. Kitakabe, M. Matsuda, and N. Mochizuki. 2002. Adaptor protein Crk is required for Ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells. **Mol. Biol. Cell** 13:4231-4242.
8. Sakakibara, A., Y. Ohba, K. Kurokawa, M. Matsuda, and S. Hattori. 2002. Novel function of Chat in controlling cell adhesion via Cas-Crk-C3G-pathway-mediated Rap1 activation. **J. Cell Sci.** 115:4915-4924.
9. Sawano, A., S. Takayama, M. Matsuda, and A. Miyawaki. 2002. Lateral propagation of EGF signalling after local stimulation depends on receptor density. **Dev. Cell** 3:245-257.
10. Takahashi, H., H. Sawa, H. Hasegawa, T. Sata, W. Hall, and T. Kurata. 2002. Binding and dissociation of human topoisomerase I with hairpin-loop RNAs: implications for the regulation of HIV-1 replication. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 297:593-599
11. Takahashi, H., H. Sawa, H. Hasegawa, T. Sata, W. W. Hall, K. Nagashima, and T. Kurata. 2002. Reconstitution of cleavage of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) RNAs. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 293:1084-1091
12. Takahashi, H., H. Sawa, H. Hasegawa, Y. Shoya, T. Sata, W. W. Hall, K. Nagashima, and T. Kurata. 2002. Topoisomerase I and ATP activate cDNA synthesis of human immunodeficiency virus type 1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 294:509-517
13. Hasegawa, H., M. Tatsumi, K. Ogawa-Goto, H. Takahashi, T. Iwasaki, T. Kurata, T. Sata, T. Takeuchi, N. Sheehy, H. Sawa, K. Nagashima, and W.W. Hall. 2002. Processing of the HTLV-II envelope precursor glycoprotein, gp63 by furin is essential for cell fusion activity. **AIDS Res. Hum. Retrovir.** 18:1253-1260.
14. Okada, Y., H. Sawa, S. Endo, Y. Orba, T. Umemura, H. Nishihara, A. C. Stan, S. Tanaka, H. Takahashi, and K. Nagashima. 2002. Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. **Acta Neuropathol. (Berl)** 104:130-136
15. Hasegawa, H., S. Kadowaki, I. Watanabe, H. Aizawa, H. Takahashi, T. Iwasaki, S. Tamura, T. Kurata, and T. Sata. 2002. Persistent infection of influenza virus in irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination. **Vaccine** 20:1050-1057
16. Ohba, Y., K. Kurokawa, and M. Matsuda. 2003. Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. **EMBO J.** 22:859-869.

7. 知的所有権の取得状況

該当無し