

厚生労働科学研究費補助金 (ヒトゲノム・再生医療等 研究事業)  
総括研究報告書

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** 動脈硬化症発症・増悪の原因解明のために低分子量 GTP 結合蛋白質制御因子 (GDP/GTP 交換因子(GEF)と GTPase 活性化因子(GAP)) の機能を解析することを目的に本研究を行った。ゲノム情報で得られる新規 GEF・GAP の基質特異性を決定する新たな解析方法を開発(FRET 原理によるプローブを作製)して、新規低分子量 GTP 結合蛋白質制御因子の基質特異性を R-Ras ファミリについて決定した。昨年度同定した血管平滑筋特異的に発現する Vsm-RhoGEF とについてその Rho 活性化メカニズムを調べた。

#### 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 北海道大学大学院医学研究科  
分子細胞病理学講座 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リングを行なうべく、Ras, Rap1, R-Ras, Ral, Rho ファミリー分子の可視化プローブの開発をおこなう。新たに同定した GEF, GAP の動脈硬化症における役割を解明する。

#### B. 研究方法

血管平滑筋細胞における Vsm-RhoGEF の発現パターンの解析と局在変化の検討—血管平滑筋細胞 Human Coronar Artery Endothelial Cells とラット大動脈血管平滑筋細胞(A7r5)における Vsm-RhoGEF の発現を免疫組織化学的に調べた。抗体は anti-VsmRhoGEF (C末の抗体)を用いた。また、ephrin-A1 刺激後の局在変化についても検討した。stress fiber 形成と Vsm-RhoGEF の局在の関係を調べるために ephrin-A1 刺激前後でのアクチンの染色を Rhodamin-phalloin 染色で調べた。Vsm-RhoGEF のさまざまな欠失変異体を作製しこれに Green Fluorescent Protein のタグをつけて A7r5 に導入し、その発現パターンを分析することで局在シグナルの有無を検討した。欠失変異体は Dbl ホモロジー/Pleckstrin ホモロジーからなる後半の変異体と N 末端のプロリンに富んだ部位からなるものを主に調べた。

生化学的な Vsm-RhoGEF の膜移行の検討—A7r5 細胞を ephrin-A1 刺激した際の内因性 Vsm-RhoGEF の局在変化を検討した。Triton-X100 可溶性画分あるいは不溶性画分に Vsm-RhoGEF が集まるのかを調べた。

R-Ras GEF/GAP 測定プローブの作成—プローブの

作成は昨年度までに報告した方法に基づき行った。pRaichu-R-Ras のプローブである Raichu-R-Ras はアミノ末端から順に、YFP、スパーサー、R-Ras、スパーサー、RalGDS の Ras 結合領域、スパーサー、CFP、スパーサー、R-Ras のカルボキシル末端領域から成る。接尾語に用いた-V38 と-N43 は、それぞれ R-Ras の Gly38 と Ser43 が Val と Ala に置換されている変異体の表記に用いた。

GEF 活性と GAP 活性の解析—COS7 細胞をコーゲンコートしたガラス底の 35 mm 径プレート (アサヒテクノグラス)に播き、pRaichu-R-Ras と GEF または GAP をコードした発現ベクターを組み合わせて、Polyfect (Qiagen)を用いてトランスフェクションした。24 時間後、無血清 MEM 培地に交換し、イメージングを行った。画像解析ソフト Metamorph を用いて、FRET 画像を取得した。各細胞内に領域を指定し、その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。このデータを一昨年の報告書に記載のプログラムを用いて解析した。

Raichu-R-Ras を用いたイメージング

Raichu-R-Ras プローブを COS7 細胞に発現させ、24 時間後に撮影を開始した。CoolSNAP HQ CCD カメラを備えたオリンパス IX70 倒立型顕微鏡で観察し、CFP の蛍光画像および、CFP から黄色蛍光蛋白 (YFP) への蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) により観察される YFP の蛍光画像を取得し、この 2 枚の画像の蛍光強度比を図ることで、RalA の活性を測定した。まず、血清飢餓状態に 4 時間以上おいてから、30 分撮影し、そこで上皮細胞増殖因子を最終濃度 20 ng/ml になるように添加し、さらに 60 分撮影した。

DOCK2 の機能解析

プラスミド pCXN2-Flag-DOCK2、pCXN2-Flag-DOCK2-dCS、pCXN2-Vav を作製。抗 DOCK2 抗体は当該研究室で作製した。抗 Flag、Crk、Vav 抗体は sigma, santa cruz, B&D transduction よりそれぞれ購入した。トランスフェクション・免疫沈降法・ウエスタンブロット法は通常の分子生物学的ならびに細胞生物学的手法を用いて行った。

(倫理面への配慮)

各施設の動物実験取扱規定に従い行った。

### C. 研究結果

Vsm-RhoGEF はアクチンストレスファイバーに局在する：Vsm-RhoGEF の局在を調べたところ ephrin-A1 刺激前には actin stress fiber に局在している。A7r5 細胞を固定後 Anti-VsmRhoGEF で incubation 後 Alexa488 で緑に発色して、Rhodamine Phalloidin でアクチンを染色すると局在が一致した。

Vsm-RhoGEF のどの部分がアクチンへの局在に重要かを調べるため、trauvation mutant を作製してその局在を調べた。プロリンに富む N 末端がアクチンへの局在に不可欠であった。Vsm-RhoGEF の全長に GFP タグを付加して A7r5 細胞に発現させるとアクチン上には局在しなかった。ところが、DH/PH 内にあるチロシンリン酸化部位 (Y507, Y510 Y516 Y521) を F に変異させ Vsm-RhoGEF 変異体は GFP タグをつけて A7r5 細胞に発現させるとアクチンストレスファイバーに局在するので、この部位のリン酸化が局在変化に重要である可能性が示唆された。

Vsm-RhoGEF の Ephrin-A1 刺激による膜移行：A7r5 細胞を ephrin-A1 刺激した前後での Vsm-RhoGEF の分布を生化学的に調べた。刺激前には Triton-X100 可溶性画分にほとんどあったが、ephrin-A 刺激により、Triton-X100 不溶性画分に移行することがわかった。これは膜への移行を示唆している。昨年まで EphA4 に Vsm-RhoGEF が結合することを明らかにしたが、この複合体の中にあらたにわれわれは EphA2 が含まれていることを明らかにした。Ephrin-A1 刺激後の A7r5 細胞を可溶化した後、抗 Vsm-RhoGEF 抗体で免疫沈降すると EphA4 とは違うリン酸化バンドを検出した。これは Vsm-RhoGEF のリン酸化を示すと考えていたが、抗 EphA2 抗体でこのバンドが検出できることから、EphA4-EphA2-Vsm-RhoGEF complex が ephrin-A1 刺激依存性に形成されることがわかった。

Raichu-R-Ras の開発：R-Ras のプローブはまず、R-Ras と R-Ras の標的分子 Raf とを組み合わせで行った。R-Ras と標的分子の順番を替えることならびに、R-Ras の N 末側および C 末側を様々に変化させることで、FRET 効率の高いプローブの開発を試みた。しかし、いずれのプローブにおいても、野生型と恒常的活性化型である V38 変異体との FRET 効率に大きな差異は得られなかった。その原因を探るため、これらのプローブ上の GTP/GDP 比を TLC を用いた分析した。その結果、R-Ras と Raf の組み合わせのプローブにおいては、野生型の R-Ras プローブにおいても、GTP/GDP が内在性のそれよりも非常に高くなっていることがわかった。このことは、Raf が R-Ras GAP を強く阻害している可能性を示唆する。R-Ras の本来の標的分子ではない RalGDS の Ras 結合領域を使用した。その結果、野生型と恒常的活性化型である V38 変異体との FRET 効率に大きな差異のあるプローブを作成することができた。

Raichu-R-Ras を用いた R-Ras の GEF と GAP のスクリーニング：CalDAG-GEFII が R-Ras に対してもっとも強い GEF 活性を有していること、R-RasGAP、GAP1m が R-Ras に対して GAP 活性を有していることなどがわかった。

プローブ上の GTP/GDP 比と FRET 効率の相関：Raichu-R-Ras が使えるためには FRET 効率とプローブ上の GTP/GDP 比が相関しなければならない。これを確認するために、293T 細胞にプローブをさまざまな量の CalDAG-GEFII と同時に発現させ、GTP/GDP 比と FRET 効率を平行して解析した。その結果、プローブ上の GTP が増加するにつれ、FRET 効率が増加するのが確認できた。

Raichu-R-Ras を用いたイメージング：COS7 細胞にプローブを発現させ、血清飢餓状態に置いた後に、上皮細胞増殖因子にて刺激した。その結果、上皮細胞増殖因子では R-Ras は活性化できないことがわかった。

DOCK2 と CrkL-SH3 との *in vitro* での結合：GST-CrkL-SH3 により血小板 lysate を用いて pull down assay を行ったところ、DOCK2 が沈降される事が判明した。また、他のヒト血球細胞 Jurkat, Molt4 においても同様に CrkL-SH3 と DOCK2 が結合する事が示された。DOCK2 と他の分子の SH3 との結合を調べたが、grb2, able, src, PI3K-p85, MLK3 の SH3 と DOCK2 の結合は認めなかった。

CrkL と DOCK2 の *in vivo* での結合：293T 細胞に CRKL と DOCK2 を発現させて免疫沈降を行ったところ CRKL との結合が確認された。しかし CRKII と DOCK2 の結合は認めなかった。また、ヒト血液細胞、Jurkat, Molt4, Raji において endogenous CRKL と DOCK2 の結合が確認された。

DOCK2 の CRKL 結合領域の解析：DOCK2dCS 変異体 (1-515AA) および dBE 変異体 (939-1476AA) と CRKL が結合する事が示された。DOCK2 の C 末領域はプロリンリッチ領域を含むが CRKL との結合は認めなかった。

DOCK2 による Rac の活性化：ヒト血球細胞 Jurkat, K562 において DOCK2 は Rac を活性化することを Rac pull down assay を用いて明らかにした。またこの活性は代表的な Rac activator である vav の約 8 倍であった。また DOCK180 とほぼ同様の活性であった。さらに、DOCK2 の CRKL 結合領域 dCS は Rac を活性化しない事を確認し、さらに dCS は CRKL による Rac の活性化に対して dominant negative 効果を有することが判明した。

DOCK2 の局在：ヒト血球細胞にて CRKL と DOCK2 はアクチンファイバーと共局在することが confocal microscopy を用いた観察にて明らかになった。

DOCK2 による細胞接着能の制御：DOCK2 およびその dCS 変異体を安定発現する細胞を作製し細胞接着能を測定したところ、poly-L-lysine に比して collagen coating において dCS の細胞接着能が低下した。

## 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。これまでに Ras ファミリー分子である Ras, Rap1, Ral についてのプローブを作製してきた。本年度は細胞接着の制御に関わる R-Ras 分子の FRET-based probe を作製した。昨年度は、細胞の形態を制御する G 蛋白である Rac および Cdc42 の活性化モニターを作成した。さらに、このモニターで多くの活性化因子および不活性化因子をスクリーニングできることを示した。

これまでのプローブ作りから

- ①G 蛋白のパートナーとして用いる標的分子と G 蛋白との親和性が強すぎると GAP を阻害するので S/N 比の高いプローブを作成することができない。従って、本来は標的でない分子で弱い親和性を有するものが、プローブ構築には望ましい。
  - ②次に重要なポイントは、各素子の順番である。Ras ファミリー G 蛋白においては Ras-標的分子の順番が、Rho ファミリー G 蛋白においては、標的分子-Rho の順番が望ましい。この理由については現在のところ不明である。
  - ③FRET 蛍光プローブの各素子を繋ぐリンカー領域は、あまり厳密ではない。すなわち、様々な長さの物を作成してみたが、大きな S/N 比の変化はなかった。
  - ④高速スクリーニングするために、もっともネックになるのは、各 well 間にて焦点を合わせるのに時間がかかるという点である。今後、顕微鏡メーカーと協力して改良する必要がある。
- という知見を得た。

昨年血管平滑筋特異的に発現する Rho 活性化因子 Vsm-RhoGEF を同定したので、今年度はさらにその機能制御機構を調べた。われわれはストレスファイバーに局在していた Vsm-RhoGEF が ephrin-A1 刺激により細胞膜分画に移行することが重要であることを証明した。特に EphA4 が EphA2 と複合体をつくり Vsm-RhoGEF を膜に移行させていることが示唆された。動脈硬化症は multiple risk factor 症候群であり、高血圧がその病態の進展には深く関わる。特に Vsm-RhoGEF は血管平滑筋の収縮に関して重要であることから、炎症細胞による収縮機序だけではなく高血圧の発症から動脈硬化症の発症への関与も強く考えられる。また、日本人に特徴的な冠攣縮型狭心症に Vsm-RhoGEF が関与することも予想され今後 Vsm-RhoGEF の SNPs 解析を冠攣縮型狭心症患者さんで検討する必要があると考えられた。

DOCK2 は CRKL によって Rac を活性化し、細胞の接着を制御することが明らかとなった。また DOCK2 の dCS 変異体はこの作用に対して dominant negative 効果を発揮することが示された。今後はヒト動脈硬化組織を用いてマクロファージにおける DOCK2 の発現を調べるとともに、動脈硬化モデル動物を用いて、dCS 変異体を遺伝子導入することでその病体が重

症化し、また WT の導入により食能が増加し、粥状効果病変が軽減するか否かを検討する。

## E. 結論

- (1)G 蛋白の一つ R-Ras 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。
- (2)Vsm-RhoGEF が Rho の活性化により血管収縮を制御するメカニズムとしてストレスファイバーから細胞膜への移行が重要である。
- (3)炎症細胞浸潤のときの細胞の遊走に不可欠な Rac の活性化が DOCK2 によって誘導されることをしめした。

## F. 健康危険情報

特記なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kogata N, Masuda M, Kamioka Y, Yamagishi A, Endo A, Okada M, Mochizuki N. Identification of fer tyrosine kinase localized on molecule-1 phosphorylating kinase in vascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* 14: 3553-3564, 2003

Ogita H, Kunimoto S, Kamioka Y, Sawa H, Masuda M, Mochizuki N. EphA4-mediated Rho activation via Vsm-RhoGEF expressed specifically in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 93: 23-31, 2003

Yoshizaki H, Ohba Y, Kurokawa K, Itoh RE, Nakamura T, Mochizuki N, Nagashima K, Matsuda M. Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.* 162: 1-10, 2003

Endo A, Fukuhara S, Masuda M, Ohmori T, Mochizuki N. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor receptor-2(VEGFR-2) identifies a central role for VEGFR-2 in human aortic endothelial cell responses to VEGF. *J. Receptor Signal Transduction* 23: 239-254, 2003

Takaya A, Ohba Y, Kurokawa K, and Matsuda M. RalA Activation at Nascent Lamellipodia of EGF-stimulated Cos7 cells and Migrating MDCK Cells. *Mol. Biol. Cell*, in press.

Higuchi E, Oridate N, Furuta Y, Suzuki S, Hatakeyama H, Sawa H, Sunayashiki-Kusazaki K, Yamazaki-k, Inuyama-Y, Fukuda S: Differentially expressed genes associated with cis-diamminedichloroplatinum (II) resistance in head and neck cancer using differential display and cDNA microarray. *Head Neck* 25: 187-93, 2003

Shoya Y, Tokunaga T, Sawa H, Maeda M, Ueno T, Yoshikawa T, Sata T, Kurata T, Hall WW, Cullen BR, Takahashi H: Human topoisomerase I promotes HIV-1 proviral DNA synthesis: implications for the species specificity and cellular tropism of HIV-1 infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100: 8442-8447, 2003

Ricciardiello L, Baglioni M, Giovannini C, Pariali M, Cenacchi G, Ripalti A, Landini MP, Sawa H, Nagashima K, Frisque RJ, Goel A, Boland CR, Tognon M, Roda E, Bazzoli F: Induction of Chromosomal Instability in Colonic Cells by the Human Polyomavirus JC Virus. **Cancer Res.** 63: 7256-62, 2003

Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Nagashima K, Sata T, Kurata T: Topoisomerase I dissociates human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase from genomic RNAs. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 313: 1073-1078, 2004

Ueno T, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Chiba J, Kojima A, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Kurata T, Takahashi H: Nucleolin and the packaging signal, promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). **Microbiol. Immunol.** 48: 111-118, 2004

## 2. 学会発表

高谷昭行、大場雄介、松田道行：上皮細胞増殖因子による RalA 活性化の時空間的解析  
第 26 回日本分子生物学会年会 神戸  
平成 15 年 12 月 10 日—13 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
該当無し

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 循環器形態部部长

**研究要旨** 血管平滑筋細胞の形質変化が動脈硬化症では起きていると考えられている。血管平滑筋収縮は Ca 依存性の収縮と Ca 非依存性の収縮(低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho による Rho キナーゼ調節による)がある。Vascular Smooth Muscle-specific RhoGEF (Vsm-RhoGEF)が EphA4 チロシンキナーゼの下流で機能して Rho の活性化を調節していることを明らかにしたが、本年度はその詳細な局在と ephrin-A1 刺激による膜移行が Rho の活性化に重要であることを明らかにした。

**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。血管内皮細胞と血管平滑筋細胞で特異的に発現する GEF, GAP に着目してその機能を調べる。昨年度にこの Rho の新規 GEF として Vascular smooth muscle-specific RhoGEF (Vsm-RhoGEF) を同定した。この GEF の Rho 活性化のメカニズムを詳細に検討する目的で研究をおこなった。

**B. 研究方法**

血管平滑筋細胞における Vsm-RhoGEF の発現パターンの解析と局在変化の検討—血管平滑筋細胞 Human Coronar Artery Endothelial Cells とラット大動脈血管平滑筋細胞(A7r5)における Vsm-RhoGEF の発現を免疫組織化学的に調べた。抗体は anti-VsmRhoGEF (C末の抗体)を用いた。また、ephrin-A1 刺激後の局在変化についても検討した。stress fiber 形成と Vsm-RhoGEF の局在の関係を調べるために ephrin-A1 刺激前後でのアクチンの染色を Rhodamin-phalloin 染色で調べた。Vsm-RhoGEF のさまざまな欠失変異体を作製しこれに Green Fluorescent Protein のタグをつけて A7r5 に導入し、その発現パターンを分析することで局在シグナルの有無を検討した。欠失変異体は Dbl ホモロジー/Pleckstrin ホモロジーからなる後半の変異体と N 末端のプロリンに富んだ部位からなるものを主に調べた。

生化学的 Vsm-RhoGEF の膜移行の検討—A7r5 細胞を ephrin-A1 刺激した際の内因性 Vsm-RhoGEF の局在変化を検討した。Triton-X100 可溶性画分あるいは不溶性画分に Vsm-RhoGEF が集まるのかを調べた。

(倫理面への配慮)

各施設の動物実験取扱規定に従い行った。

**C. 研究結果**

Vsm-RhoGEF はアクチンストレスファイバーに局在する：Vsm-RhoGEF の局在を調べたところ ephrin-A1 刺激前には actin stress fiber に局在している。A7r5 細胞を固定後 Anti-VsmRhoGEF で incubation 後 Alexa488 で緑に発色して、Rhodamine Phalloidin でアクチンを染色すると局在が一致した。

Vsm-RhoGEF のどの部分がアクチンへの局在に重要かを調べるため、trauvation mutant を作製してその局在を調べた。プロリンに富む N 末端がアクチンへの局在に不可欠であった。Vsm-RhoGEF の全長に GFP タグを付加して A7r5 細胞に発現させるとアクチン上には局在しなかった。ところが、DH/PH 内にあるチロシンリン酸化部位 (Y507, Y510, Y516, Y521) を F に変異させ Vsm-RhoGEF 変異体は GFP タグをつけて A7r5 細胞に発現させるとアクチンストレスファイバーに局在するので、この部位のリン酸化が局在変化に重要である可能性が示唆された。

Vsm-RhoGEF の Ephrin-A1 刺激による膜移行：A7r5 細胞を ephrin-A1 刺激した前後での Vsm-RhoGEF の分布を生化学的に調べた。刺激前には Triton-X100 可溶性画分にほとんどあったが、ephrin-A 刺激により、Triton-X100 不溶性画分に移行することがわかった。これは膜への移行を示唆している。昨年まで EphA4 に Vsm-RhoGEF が結合することを明らかにしたが、この複合体の中にあらたにわれわれは EphA2 が含まれていることを明らかにした。Ephrin-A1 刺激後の A7r5 細胞を可溶化した後、抗 Vsm-RhoGEF 抗体で免疫沈降すると EphA4 とは違うリン酸化バンドを検出した。これは Vsm-RhoGEF のリン酸化を示すと考えていたが、抗 EphA2 抗体でこのバンドが検出できることから、EphA4-EphA2-Vsm-RhoGEF complex が ephrin-A1 刺激依存性に形成されることがわかった。

**D. 考察**

Ca 非依存性の血管収縮メカニズムはこれまでアンジオテンシン・エンドセリンなどの液性因子から 7 回膜貫通型受容体を刺激して p115RhoGEF-Rho の活性化によるシグナルが主であると考えられてきたが、われわれは、EphA-Vsm-RhoGEF-Rho シグ

ナル系を新たに見出した。これは特に炎症細胞浸潤によりリンパ球・単核球の表面に発現する ephrinA1 による血管平滑筋の EphA チロシンキナーゼ受容体の活性化により引き起こされると考える。

この Vsm-RhoGEF による Rho の活性化のメカニズムとして、われわれはストレスファイバーに局在していた Vsm-RhoGEF が ephrin-A1 刺激により細胞膜分画に移行することが重要であることを証明した。特に EphA4 が EphA2 と複合体をつくり Vsm-RhoGEF を膜に移行させていることが示唆された。

動脈硬化症は multiple risk factor 症候群であり、高血圧がその病態の進展には深く関わる。特に Vsm-RhoGEF は血管平滑筋の収縮に関して重要であることから、炎症細胞による収縮機序だけではなく高血圧の発症から動脈硬化症の発症への関与も強く考えられる。また、日本人に特徴的な冠攣縮型狭心症に Vsm-RhoGEF が関与することも予想され今後 Vsm-RhoGEF の SNPs 解析を冠攣縮型狭心症患者さんで検討する必要があると考えられた。

#### E. 結論

Vsm-RhoGEF の Rho 活性化による血管収縮のメカニズムを検討した。アクチンストレスファイバー上に存在する Vsm-rhoGEF が ephrin-A 刺激により膜移行し、そこで Rho の活性化を引き起こすことが重要であることを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

特記なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kogata N, Masuda M, Kamioka Y, Yamagishi A, Endo A, Okada M, Mochizuki N. Identification of fer tyrosine kinase localized on molecule-1 phosphorylating kinase in vascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* 14: 3553-3564, 2003

Ogita H, Kunimoto S, Kamioka Y, Sawa H, Masuda M, Mochizuki N. EphA4-mediated Rho activation via Vsm-RhoGEF expressed specifically in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 93: 23-31, 2003

Yoshizaki H, Ohba Y, Kurokawa K, Itoh RE, Nakamura T, Mochizuki N, Nagashima K, Matsuda M. Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.* 162: 1-10, 2003

Endo A, Fukuhara S, Masuda M, Ohmori T, Mochizuki N. Selective inhibition of vascular

*endothelial growth factor receptor-2(VEGFR-2) identifies a central role for VEGFR-2 in human aortic endothelial cell responses to VEGF. J. Receptor Signal Transduction* 23: 239-254, 2003

Nagaya K, Kanagawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation* 108: 889-895, 2003

##### 2. 学会発表

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

FRET プローブ観察のための分光処理装置（特許出願中）

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

cDNAプロジェクトにて発見されたG蛋白活性制御因子群の網羅的基質特異性の決定

分担研究者 松田道行 大阪大学微生物病研究所 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、より効率の良いスクリーニングシステムが必要である。本研究では蛍光共鳴エネルギー移動を利用したプローブ群を開発し、蛋白の機能を簡便にアッセイする系を開発している。本年度はRasファミリーG蛋白の一つR-Ralの活性制御因子をスクリーニングするための生細胞プローブの作成を行った。

#### 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く存在することが推測されている。これらの蛋白の異常は癌、免疫、神経疾患など多くの疾患の原因となることがわかっており、今後、これらの蛋白を標的とした治療薬の開発を進めていく必要がある。しかし、現在のアミノ酸構造比較のレベルでは、蛋白の機能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。そこで、本研究では、G蛋白の活性制御因子群の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。本年度は、RasファミリーおよびRhoファミリーの分子群のプローブのうちこれまで成功していなかったR-Rasについてプローブの開発を行った。

#### B. 研究方法

**プローブの作成** プローブの作成は昨年度までに報告した方法に基づき行った。pRaichu-R-RasのプローブであるRaichu-R-Rasはアミノ末端から順に、YFP、スペーサー、R-Ras、スペーサー、RalGDSのRas結合領域、スペーサー、CFP、スペーサー、R-Rasのカルボキシル末端領域から成る。接尾語に用いた-V38と-N43は、それぞれR-RasのGly38とSer43がValとAlaに置換されている変異体の表記に用いた。

**細胞および抗体** COS7細胞は10%血清を含むDMEM培地で培養した。R-Rasに対する抗体はSanta Cruz社より購入した。

**GEF活性とGAP活性の解析** COS7細胞をコラーゲンコートしたガラス底の35 mm径プレート（アサヒテクノグラス）に播き、pRaichu-R-RasとGEFまたはGAPをコードした発現ベクターを組み合わせ、Polyfect（Qiagen）を

用いてトランスフェクションした。24時間後、無血清MEM培地に交換し、イメージングを行った。画像解析ソフトMetamorphを用いて、FRET画像を取得した。各細胞内に領域を指定し、その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。このデータを一昨年の報告書に記載のプログラムを用いて会席した。

**プローブ上のグアニンヌクレオチドの定量** 293T細胞にプローブを発現させ<sup>32</sup>P正リン酸にて標識する。プローブを抗GFP抗体で免疫沈澱した後、結合しているオリゴヌクレオチドを薄層クロマトグラフィーにて分離定量する。定量にはBAS1500イメージアナライザーを用いた。

**Raichu-R-Rasを用いたイメージング** Raichu-R-RasプローブをCOS7細胞に発現させ、24時間後に撮影を開始した。CoolSNAP HQ CCDカメラを備えたオリンパスIX70倒立型顕微鏡で観察し、CFPの蛍光画像および、CFPから黄色蛍光蛋白（YFP）への蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）により観察されるYFPの蛍光画像を取得し、この2枚の画像の蛍光強度比を図ることで、RalAの活性を測定した。まず、血清飢餓状態に4時間以上おいてから、30分撮影し、そこで上皮細胞増殖因子を最終濃度20 ng/mlになるように添加し、さらに60分撮影した。

#### C. 研究結果

**Raichu-R-Rasの開発①:** R-Rasのプローブはまず、R-RasとR-Rasの標的分子Rafとを組み合わせで行った。R-Rasと標的分子の順番を替えることならびに、R-RasのN末側およびC末側を様々に変化させることで、FRET効率の高いプローブの開発を試みた。しかし、いずれのプローブにおいても、野生型と恒常的活性化型であるV38変異体とのFRET効率に大きな差異は得られなかった。その原因を探るため、これらのプローブ上のGTP/GDP比をTLCを用いた分析した。その結果、R-RasとRafの組み合わせのプローブにおいては、野生

型のR-Rasプローブにおいても、GTP/GDPが内在性のそれよりも非常に高くなっていることがわかった。このことは、RafがR-Ras GAPを強く阻害している可能性を示唆する。

Raichu-R-Rasの開発②：そこで、R-Rasの本来の標的分子ではないRalGDSのRas結合領域を使用した。その結果、野生型と恒常的活性化型であるV38変異体とのFRET効率に大きな差異のあるプローブを作成することができた。

Raichu-R-Rasを用いたR-RasのGEFとGAPのスクリーニング：一昨年度の報告書に記載したスクリーニング法を用いて、R-RasのGEFとGAPを検索した。その結果、CalDAG-GEFIIがR-Rasに対してもっとも強いGEF活性を有していること、R-RasGAP、GAP1mがR-Rasに対してGAP活性を有していることなどがわかった。

プローブ上のGTP/GDP比とFRET効率の相関：Raichu-R-Rasが使えるためにはFRET効率とプローブ上のGTP/GDP比が相関しなければならない。これを確認するために、293T細胞にプローブをさまざまな量のCalDAG-GEFIIと同時に発現させ、GTP/GDP比とFRET効率を平行して解析した。その結果、プローブ上のGTPが増加するにつれ、FRET効率が増加するのが確認できた。

Raichu-R-Rasを用いたイメージング：次に、これらのプローブが実際に生きた細胞で使えるかを調べた。COS7細胞にプローブを発現させ、血清飢餓状態に置いた後に、上皮細胞増殖因子にて刺激した。その結果、上皮細胞増殖因子ではR-Rasは活性化できないことがわかった。

#### D. 考察

本研究の目的は、多数存在するRasスーパーファミリーG蛋白の制御因子の基質特異性を網羅的にスクリーニングする方法を確立することにある。一昨年度は、蛍光プローブを用いたスクリーニングのプロトコールならびに画像解析のためのプログラムを作成し、昨年度はRhoファミリーのプローブ作成法を確立した。これに引き続き、本年度は、これらの成果の上に、R-Rasのプローブを作成し、制御因子群の基質特異性を決定した。

まず、本年度までの研究でFRET蛍光プローブ作成とそれを用いたスクリーニングにおける重要なポイントがいくつか明らかになったので整理する。

① G蛋白のパートナーとして用いる標的分子とG蛋白との親和性が強すぎるとGAPを阻害するのでS/N比の高いプローブを作成することができない。従って、本来は標的でない分子で弱い親和性を有するものが、プローブ構築には望ましい。

② 次に重要なポイントは、各素子の順番である。RasファミリーG蛋白においてはRas-標的分子の順番が、RhoファミリーG蛋白においては、標的分子-Rhoの順番が望ましい。この理由については現在のところ不明である。

③ FRET蛍光プローブの各素子を繋ぐリンカー領域は、あまり厳密ではない。すなわち、様々な長さの物を作成してみたが、大きなS/N比の変化は無かった。

④ 高速スクリーニングするために、もっともネックになるのは、各well間にて焦点を合わせるのに時間がかかるという点である。今後、顕微鏡メーカーと協力して改良する必要がある。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 結論

G蛋白の一つR-Ras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

A. Takaya, Y. Ohba, K. Kurokawa, and M. Matsuda. RalA Activation at Nascent Lamellipodia of EGF-stimulated Cos7 cells and Migrating MDCK Cells. *Mol. Biol. Cell.*, in press.

##### 2. 学会発表

高谷昭行、大場雄介、松田道行：上皮細胞増殖因子によるRalA活性化の時空間的解析 第26回日本分子生物学会年会 神戸 平成15年12月10日—13日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。



## DOCK2 による血液細胞内シグナル伝達の解析

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 Dock2 は血液細胞特異的に発現している GEF (guanine-nucleotide exchange factor) であり、単球系細胞においてはケモカインによる細胞遊走を制御する事が知られている。また、そのファミリー蛋白である Dock180 はアダプター分子 Crk と協調して細胞の貪食能を制御することが示されており、Dock2 も細胞貪食に関与することが予測される。本研究では Dock2 はアダプター分子 CrkL と結合し、Rac2 を活性化することで細胞接着能を制御することを明らかにした。今後は CrkL-Dock2 を介する動脈硬化症におけるマクロファージの貪食能のメカニズムの解明を行う予定である。

### A. 研究目的

近年、心血管の粥状動脈硬化症の患者数は増加しており、しばしば致命症となる。DCA などに加えて、疾患の分子メカニズムに基づいた効果的な予防法、治療法の確立が急務となっている。とくに foamy macrophage による atherome 貪食のメカニズムを活性化することで病変を退縮させることができれば、非侵襲的な治療法となる。本研究はその基盤研究として、血液細胞において、貪食能を制御すると考えられている Dock2 のシグナル伝達のメカニズムに焦点をあてて研究を行った。

### B. 研究方法

- 1) プラスミド：pCXN2-Flag-DOCK2、pCXN2-Flag-DOCK2-dCS、pCXN2-Vav は以前に記載した(Nishihara et al, Blood, 100, 2002)。
- 2) 抗体：抗 DOCK2 抗体は以前に記載した。抗 Flag、Crk、Vav 抗体は sigma, santa cruz, B&D transduction よりそれぞれ購入した。
- 3) トランスフェクション：
- 4) 免疫沈降法：
- 5) ウエスタンブロット法：
- 6) 免疫染色方法：
  - ①抗原賦活化：抗原を賦活化するために切片は 10mM sodium citrate pH6.0 に浸した上で圧力釜で 3 分加熱し、その後水によって冷やした。
  - iv) 内因性 peroxidase 除去：0.02% Tween20/PBS で洗浄後 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 15 分処理し再度 0.02% Tween20/PBS で洗浄した。
  - ②免疫反応：10% goat normal serum に 30 分反応させた後、作製した anti-KIAA0915C または anti-KIAA0915-48 を 1,000 倍にして 4°C overnight で反応させた。反応液 0.02% Tween20/PBS で洗浄した後に Biotinylated goat anti-rabbit IgG で 37°C、30 分間反応させた。0.02% Tween20/PBS で洗浄後、peroxidase-labeled streptavidin で 30 分間反応させ、3, 3'-diaminobenzidine で発色させた。
  - ③観察：免疫染色を行った slide は顕微鏡 (Olympus, BX51) で観察の後、Provis (Olympus, AX80) で画像 file を作製した。

### C. 研究結果

- ①DOCK2 と CrkL-SH3 との in vitro での結合：GST-CrkL-SH3 により血小板 lysate を用いて pull down assay を行ったところ、DOCK2 が沈降される事が判明した。また、他のヒト血球細胞 Jurkat, Molt4 においても同様に CrkL-SH3 と DOCK2 が結合する事が示された。DOCK2 と他の分子の SH3 との結合を調べたが、grb2, able, src, PI3K-p85, MLK3 の SH3 と DOCK2 の結合は認めなかった。CrkL のファミリー蛋白である Crk とは CrkSH3 と DOCK2 の結合は認めるものの CRK の wild type と DOCK2 の結合は確認できなかった。
- ②CrkL と DOCK2 の in vivo での結合：293T 細胞に CRKL と DOCK2 を発現させて免疫沈降を行ったところ CRKL との結合が確認された。しかし CRKII と DOCK2 の結合は認めなかった。また、ヒト血液細胞、Jurkat, Molt4, Raji において endogenous な CRKL と DOCK2 の結合が確認された。
- ③DOCK2 の CRKL 結合領域の解析：DOCK2dCS 変異体 (1-515AA) および dBE 変異体 (939-1476AA) と CRKL が結合する事が示された。DOCK2 の C 末領域はプロリンリッチ領域を含むが CRKL との結合は認めなかった。
- ④DOCK2 による Rac の活性化：ヒト血球細胞 jurkat, K562 において DOCK2 は Rac を活性化することを Rac pull down assay を用いて明らかにした。またこの活性は代表的な Rac activator である vav の約 8 倍であった。また DOCK180 とほぼ同様の活性であった。さらに、DOCK2 の CRKL 結合領域 dCS は Rac を活性化しない事を確認し、さらに dCS は CRKL による Rac の活性化に対して dominant negative 効果を有することが判明した。
- ⑤ヒト血球細胞にて CRKL と DOCK2 はアクチンファイバーと共局在することが confocal microscopy を用いた観察にて明らかになった。
- ⑥DOCK2 による細胞接着能の制御：DOCK2 およびその dCS 変異体を安定発現する細胞を作製し細胞接着能を測定したところ、poly-L-lysine に比して collagen coating において dCS の細胞接着能が低下した。

#### D. 考察

本研究において DOCK2 は CRKL によって Rac を活性化し、細胞の接着を制御することが明らかとなった。また DOCK2 の dCS 変異体はこの作用に対して dominant negative 効果を発揮することが示された。今後はヒト動脈硬化組織を用いてマクロファージにおける DOCK2 の発現を調べるとともに、動脈硬化モデル動物を用いて、dCS 変異体を遺伝子導入することでその病体が重症化し、また WT の導入により食能が増加し、粥状効果病変が軽減するかどうかを検討する。将来的に動脈硬化治療法確立の基盤技術の開発を目指す。

#### E. 結論

DOCK2 は血液細胞において CRKL 結合することで Rac を活性化し、細胞接着を制御することが判明した。

#### F. 健康危険情報

特記なし。

#### G. 研究発表

1) Yamamoto S, Furukawa H, Kitamoto T, Takamaru Y, Morita N, Yasuda M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K: An atypical form of sporadic panencephalopathic Cleutzfeldt-Jakob disease in Japan. *Neuropath Appl. Neurobiol.* 29: 77-80, 2003

2) Higuchi E, Oridate N, Furuta Y, Suzuki S, Hatakeyama H, Sawa H, Sunayashiki-Kusazaki K, Yamazaki-k, Inuyama-Y, Fukuda S: Differentially expressed genes associated with cis-diamminedichloroplatinum (II) resistance in head and neck cancer using differential display and cDNA microarray. *Head Neck* 25:187-93, 2003

3) Ishikawa R, Kikuchi H, Jin M, Fujita M, Itoh T, Sawa H, Nagashima K: Desmoplastic malignant mesothelioma of the pleura: Autopsy reveals asbestos exposure. *Pathol. Int.* 53: 401-406, 2003

4) Orba Y, Nishihara H, Sawa H, Ito T, Shimizu M, Tanaka S, Nagashima K: Application of laser capture microdissection on cytological specimens for detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement of malignant lymphoma. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 99: 198-204, 2003

5) Nagashima T, Mizutani Y, Kawahara H, Maguchi S, Terayama Y, Shinohara T, Orba Y, Chuma T, Mano Y, Itoh T, Sawa H, Sakai K, Motomura M, Nagashima K. Anti-Hu paraneoplastic syndrome presenting with brainstem-cerebellar symptoms and Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neuropathology* 23: 230-238, 2003

6) Endo S, Okada Y, Orba Y, Nishihara H, Tanaka S,

Nagashima K, Sawa H: JC virus (JCV) agnoprotein colocalizes with tubulin. *J. Neurovirol* 9 (Suppl 1): 10-14, 2003

7) Shoya Y, Tokunaga T, Sawa H, Maeda M, Ueno T, Yoshikawa T, Sata T, Kurata T, Hall WW, Cullen BR, Takahashi H: Human topoisomerase I promotes HIV-1 proviral DNA synthesis: implications for the species specificity and cellular tropism of HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 8442-8447, 2003

8) Ogita H, Kunimoto S, Kamioka Y, Sawa H, Matsuda M, Mochizuki N: EphA4-mediated Rho activation via Vsm-RhoGEF expressed specifically in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 93: 23-31, 2003

9) Watanabe I, Ross TM, Tamura Si, Ichinohe T, Ito S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H: Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused hemagglutinin. *Vaccine.* 21: 4532-4538, 2003

10) Ohnishi A, Sawa H, Tsuda M, Sawamura Y, Marukawa K, Iwasaki Y, Nagashima K: Expression of the oligodendroglial lineage-associated markers Olig1 and Olig2 in different types of human gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62: 1052-1059, 2003

11) Ricciardiello L, Baglioni M, Giovannini C, Pariali M, Cenacchi G, Ripalti A, Landini MP, Sawa H, Nagashima K, Frisque RJ, Goel A, Boland CR, Tognon M, Roda E, Bazzoli F: Induction of Chromosomal Instability in Colonic Cells by the Human Polyomavirus JC Virus. *Cancer Res.* 63:7256-62, 2003

12) Teramoto T, Kaneko H, Futano M, Sawa H, Nagashima K, Hirose Y, Kondo N: Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient with X-linked agammaglobulinemia. *Scand. J. Infect. Dis.* 35: 910-911, 2003

13) Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Nagashima K, Sata T, Kurata T: Topoisomerase I dissociates human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase from genomic RNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 1073-1078, 2004.

14) Ueno T, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Chiba J, Kojima A, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Kutrata T, Takahashi H: Nucleolin and the packaging signal, ? promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiol. Immunol.* 48: 111-118, 2004

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

mRNA 安定化機構を阻害して抗因子剤として作用する薬剤のスクリーニング法 (特願2003-173792号)

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし