

平成15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

目 次

課題番号

<p>20030895A KH21009</p>	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 …… 1
<p>896A KH21010</p>	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
<p>897A KH21011</p>	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	松田道行 …… 19
<p>898A KH21012</p>	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	新井洋由 …… 25
<p>899A KH21013</p>	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	葛西正孝 …… 33
<p>900A KH21014</p>	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	井上和秀 …… 39
<p>901A KH21015</p>	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	望月直樹 …… 47
<p>902A KH21016</p>	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	上原至雅 …… 51
<p>903A KH21017</p>	肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	江崎 治 …… 55
<p>904A KH21018</p>	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	絵野沢 伸 …… 59
<p>905A KH21019</p>	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	田平 武 …… 62
<p>906A KH21020</p>	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 67
<p>907A KH21021</p>	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	鈴木和男 …… 74
<p>908A KH21022</p>	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	川 茂幸 …… 84
<p>909A KH21024</p>	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	北川隆之 …… 89
<p>910A KH21025</p>	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	山越 智 …… 95
<p>911A KH21026</p>	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	辻本豪三 …… 104
<p>912A KH21027</p>	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	桃井 隆 …… 111
<p>913A KH22071</p>	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	鈴木康夫 …… 118
<p>914A KH22072</p>	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	吉村昭彦 …… 121
<p>915A KH22073</p>	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	宮武昌一郎 …… 125
<p>916A KH22082</p>	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	目加田英輔 …… 133

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

研究要旨 RhoファミリーG蛋白の活性を測定するRaichu-Rhoプローブを完成させ、これを用いてPC12細胞が神経細胞へ分化する過程におけるRhoファミリーG蛋白の時空間制御を明らかにした。さらに、セリンスレオニンリン酸化酵素であるMAPKの活性測定のための分子プローブを開発した。また、Crkアダプター分子の動態を生きた細胞で観察することに成功した。一方、HIV-1の複製過程に関与する情報伝達因子としてtopoisomerase Iの解析を行い、この分子のRNAリガーゼ活性がHIV-1の効率的な複製に重要であることを示した。

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 武本浩

A. 研究目的

細胞内情報伝達系を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発のための基盤研究を行う。特にRasファミリーG蛋白、チロシンリン酸化酵素、トポイソメラーゼを標的とした研究を行う。

RasファミリーG蛋白は、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。特にそのプロトタイプであるRasは、癌化にもっとも大きく寄与する癌遺伝子として知られている。われわれは、これら癌遺伝子をはじめとする情報伝達分子の活性化状態を生きた細胞でモニターする分子プローブの開発を行っている。これにより、情報伝達分子の活性化に関する時空間情報が得られるのみならず、これら情報伝達分子を標的とした薬剤の活性測定が、生きた細胞で簡便に行うことができるようになる。本年度は、この研究をさらに進め、神経細胞の分化誘導時にRhoファミリーG蛋白の活性がどのように変化するかについて検討する。さらに、低分子量G蛋白のシグナルを受けて、細胞の増殖や分化のシグナルを伝えるMAPKについても分子プローブを作成する。一方、チロシンリン酸化酵素の機能を制御するアダプター分子の一つとして、CrkIIが知られている。

CrkIIは癌遺伝子v-crkのヒト相同遺伝子crkの産物として松田らにより同定された。CrkIIは1つのSrc Homology 2 (SH2)ドメインと2つのSrc Homology 3 (SH3)ドメインとからなるアダプター蛋白で、細胞接着や細胞運動を制御することが明らかになりつつある。本年度は、このCrkII蛋白の動態を蛍光蛋白KAEDEを用いて追跡した。KAEDEはヒユサンゴの産物であり、紫外光照射によって緑から赤に色が変わる蛍光蛋白質である。KAEDEを用いると任意の時期に任意の細胞を特異的にマーキングして追跡する技術が可能になることが示されており、これを用いれば、CrkIIの細胞内の動態が生きた細胞内で観察できるようになることが期待される。最後に、HIV-1の複製過程を調節する情報伝達分子の解析を行うためにウイルス粒子の発芽前後におけるゲノムRNAの性状変化と感染性の関係に着目し、ゲノムRNAのフラグメント化とトポイソメラーゼIによる修復機構を調べた。

B. 研究方法

① プラスミド

RasファミリーおよびRhoファミリーG蛋白の活性化モニターであるRaichuシリーズについては昨年度に報告した。Raichu-Rac1, Raichu-Cdc42, Raichu-RhoAを本研究では使用した。pIRM21-Flag-RacN17とpIRM21-Flag-Cdc42N17は、RacとCdc42の優勢劣性変異体を発現する遺伝子ベクターである。pIRM21-Flag-RacV12とpIRM21-Flag-Cdc42V12は、RacとCdc42の恒常的活性化型変異体を発現する遺伝子

ベクターである。pIRM21-Flag-CdGAPはCdc42特異的なGTPase活性促進因子(GAP)の発現ベクター、pIRM21-N-WASP-CRIBは、N-WASP蛋白のCdc42結合領域を発現するベクターである。pCS2-KAEDEは理研脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チームの宮脇博士より供与いただいた。このDNAをもとにKAEDEの発現ベクターpCAGGS-Flag-KAEDEを作製した。ここに、野生型のCrkIIおよびチロシンリン酸化部位を欠損したCrkIIY221F変異体のcDNAを導入したpCAGGS-KAEDE-CrkIIWTとpCAGGS-KAEDE-CrkIIY221Fをそれぞれ作製した。

② PC12細胞の分化誘導時におけるRhoファミリーG蛋白のイメージング

PC12細胞を直径35 mmのコラーゲンコートしたガラス底の培養皿(アサヒテクノグラス、東京)に播き直し、リポフェクタミン2000(Invitrogen)を用いてプラスミドをトランスフェクションした。分化誘導時には、トランスフェクションした細胞を24時間後に、培地を無血清のもの(フェノールレッド不含DMEM/F12に0.1%の牛血清アルブミンを加えたもの)と交換し、約6時間後に撮影を開始し、約20分後に50 ng/mlの神経細胞増殖因子(NGF)を加えた。細胞分化過程を撮影する際は長時間にわたるため、ミネラルオイルで重層し、乾燥を防いだ。冷却CCDカメラCoolSNAP HQ(Roper Scientific, Trenton, NJ)を備えたOlympus IX70倒立顕微鏡をMetaMorph software(Universal Imaging, West Chester, PA)で制御し30秒毎に約1時間撮影した。YFPとCFPの画像を取得するため、440AF21励起フィルター、455DRLPダイクロイックミラー、そしてCFPとYFPに対する蛍光フィルター480AF30と535AF25(Omega Optical Inc.)を使用した。細胞は10%NDフィルターと60倍対物レンズを通した75 Wキセノンランプからの光を照射した。ピンングは4 x 4に設定し、0.1秒間励起させた。撮影後、画像のバックグラウンドを引き、MetaMorph softwareを用いてYFP/CFPレシオ画像を作成し、これをFRET効率として表示した。

③ 神経突起伸展アッセイ

RacおよびCdc42の変異体を発現するプラスミドとGFPを発現するプラスミドとをPC12細胞に共発現させる。NGF処理後2.5日後に、神経突起を伸ばしている細胞を定量した。

④ MAPKの活性化モニターの作成

ERK2のN末およびC末に黄色蛍光蛋白

(YFP)とシアン色蛍光蛋白(CFP)を融合させたモニター分子を作製しERMOND(ERK monitoring device)と命名した。非刺激時には、ERMONDはMEKと結合した状態をとる。その際、モニター分子で構造変化が生じ、YFPとCFPが近接する。EGF刺激によりERM-ONDがMEKからリン酸化されると、MEKと解離する。この時433 nmのCFPの励起光で照射すると、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が生じ、527 nmのYFPからの蛍光が観察される。

⑤ HIV-1活性制御を司る情報伝達分子の検索

HIV-1は発芽後ゲノムRNAにニックが入りフラグメント化していることが判明している。このニックが感染性に与える影響を調べた。一方、フラグメント化と修復機構を調べるためにmRNAの3'側非翻訳領域にあるAU-rich element(ARE)を通じて安定性が制御されていることが報告されているGM-CSF mRNAのAREシーケンスを用いた。GM-CSF mRNAの安定性制御とHIV-1粒子内へRNAを認識して取り込まれRNAライゲース活性によりゲノムRNAを修復していると考えられるtopoisomerase Iの作用の関係を調べた。

C. 研究結果

① NGF誘導性神経突起伸展におけるRac1とCdc42の活性変化

FRETプローブを使って、NGF添加後24時間以上にわたり、神経突起伸展に伴いRac1およびCdc42の活性が変化する様子をPC12細胞で観察した。光毒性を最小にするために、この実験においては撮影は30分に一度とした。まず、NGF添加直後より、球形のPC12細胞は、小さな神経突起の伸展と退縮を繰り返す。Rac1とCdc42の活性化は、このような新しい伸展してくる神経突起に顕著に観察された。神経突起伸展の様子をさらに詳細に観察するために、NGFを添加して24時間後に2分間隔で撮影した。その結果、Rac1とCdc42は、神経突起が伸展する際に活性化され、退縮する際には、活性が低下することがわかった。

② Rac1とCdc42の活性化のパターンの空間的解析

詳細に検討すると、Rac1とCdc42の活性化部位は異なっていることが明らかになった。すなわち、Rac1の活性が高い領域は、神経突

起の遠位端半分程度に及ぶのに対し、Cdc42の高い活性化は、神経突起の一番端に限局していた。このような、活性分布の差が、FRETプローブの分布の差によるものではないことを確認するために、それぞれのプローブにKRas蛋白のC末端領域を結合させて、細胞膜に限局して発現させた。結果は、以前のものと異ならなかったもので、やはり、Rac1とCdc42の活性化分布は異なることが結論付けられた。

③ NGF刺激直後のRac1とCdc42の活性化のパターン

NGF刺激直後のRac1とCdc42の活性化分布を同様にして解析した。NGF刺激後、3-5分以内に、Rac1もCdc42も広範に細胞膜で活性化されることがわかった。この活性化は一過性で30分以内には定常状態にもどった。しかし、②で観察されたようにNGF存在下で神経突起の伸展が起きる場所では局所的にRac1やCdc42の活性化が認められた。この結果と生化学的結果とを対応付けるためにFRET画像で検出できた活性化を細胞全体で平均化して表した。その結果、刺激後5分をピークとする一過性のRac1とCdc42の活性化があること、その後、間歇的に活性化が起きていることが、このFRETイメージでわかった。しかし、間歇的な活性化と不活性化は細胞ごとに強調して起きるわけではないので、生化学的に、多くの細胞を一緒に解析すると、この変化は容易に見逃されてしまうであろう事がわかる。これに対して、コントロール実験として行ったRasの活性化のFRET画像ではRasが同じく5分をピークとして活性化されるものの、その後、徐々に活性は下がり、間歇的な活性化は見られないことが明らかである。

④ 局所的にRac1とCdc42の活性化と神経突起伸展の関係

次に、このような局所的なRac1やCdc42の活性化が神経突起伸展にどのような役割を果たすかを解析した。Rac1およびCdc42の恒常的活性化型変異体や優勢劣性変異体をPC12細胞に発現させ、NGFで刺激後2.5日に、神経突起の伸展を定量化した。その結果、いずれの変異体でも、神経突起の伸展を抑えることがわかった。このことは、Rac1やCdc42の活性が、局所に上昇と低下を繰り返すことが神経突起の伸展に必要であることを示唆している。

⑤ MAPKの活性化モニターErmondの作成

Ras-Raf-MEK-ERK カスケードは、増殖・分化などの細胞にとって必須の情報伝達を担っている。ERKは、非刺激にはMEKと結合した形で細胞質内に存在するが、増殖刺激にตอบสนองすると、Ras-Raf-MEKの経路が活性化し、MEKによりリン酸化され、MEKから解離し、核へ移行することが知られている。ERKの活性化は免疫染色などで抗リン酸化抗体を用いることにより検出することができる。しかし生細胞内には用いることができず、一細胞におけるERKの活性化を経時的に観察するには適さないと考えられる。そこで、生きた細胞内でERKの活性化を時空間的に解析するために、FRETを利用したERKのモニター分子"ERMOND (ERK monitoring device)"を作製し、上皮細胞増殖因子(EGF)による活性化を生細胞で画像化した。様々な変異体を用いた実験より、ERMONDはMEKと結合しているときに最もFRET効率が高く、単体のときにFRET効率が低いことがわかった。ERMONDとMEK1を共発現させたHeLa細胞をEGFで刺激したところ、刺激後すぐにFRET効率が細胞質で低下し始め、それとともにERMONDの核移行が観察された。その後、徐々にFRET効率の上昇と核から細胞質への再移行が観察された。また生化学的実験から、EGFによるERMONDのリン酸化の経時変化は、内在性ERKのそれと一致した。これらの結果はERMONDが内在性ERKの活性を、生きた細胞で時空間的に解析するのに優れたプローブであることを示している。

⑥ KAEDE-CrkIIの蛍光特性及びフォトコンバージョンの測定

COS-1に蛍光蛋白KAEDEを融合したCrkを発現させ、分光装置付き蛍光顕微鏡を用いて蛍光特性を調べた。475 nmで励起したとき、400 nmの紫外光を30秒間照射すると、照射前に比べて535 nm付近に見られたピークはなくなり575 nm付近に小さなピークが見られた。また、550 nmで励起したとき、400 nmの紫外光で30秒間照射すると、照射前に比べて575 nm付近のピークが明らかに上昇しているのが確認された。また、400 nmの紫外光による褪色前と褪色後の細胞を、475 nmで励起し535DF35フィルターで取り込んだ蛍光と、550 nmで励起し575ALPフィルターで取り込んだ蛍光の像にして観察した。KAEDE-CrkIIをCOS-1に発現させて400 nmの紫外光をピンホールを通して照射すると、照射した細胞のみ、照射前に比べて緑色蛍光は褪色し、赤色蛍光が出現するのが確認された。

⑦ CrkII-WTおよびCrkII-Y221Fの細胞接着斑での動態

CrkIIの221番目チロシンがリン酸化されることがCrkIIの動態にどのような影響を与えるかを知るために、ヒト繊維肉腫細胞HT1080にKAEDE-CrkII-WTとKAEDE-CrkII-Y221Fをそれぞれ発現させた。すでに報告にあるように、CrkIIが細胞接着斑に濃縮しているのが観察され、Y221F変異体を発現した細胞ではよりその傾向が顕著であった。ピンホールを通して400nmの光で30秒間照射することによりKAEDEのフォトコンバージョンを惹起し、475nmと550nmで励起したときの蛍光像を10秒間隔で撮影した。その結果、野生型(WT)CrkIIは速やかに細胞全体に赤色が広がるとともに、2分以内には照射されていない領域の細胞接着斑も蛍光標識されることがわかった。これに対し、変異型(Y221F)CrkIIは、野生型よりも細胞内の拡散速度が遅く、また照射されていない領域の細胞接着斑が標識されるまでの時間も明らかに遅延していた。

⑧ HIV-1活性制御を司る情報伝達分子の検索

発芽後8時間経過すると上精粒子中のHIV-1 RNAは、コピー数において3割程度まで減少していた。Gag, pol, env領域について同様の結果が得られた。それぞれ約150ヌクレオチドを増幅することによってコピー数を測っているため、9.7 kでは、粒子中のゲノムRNAのうち完全な分子は1割以下まで減少すると推測できる。一方、ルシフェラーゼによる感染性測定では8時間チューブ中に放置されたウイルス粒子であっても、7割程度の感染性を示していた。合成したGM-CSFのARE RNAは合成したHIV-1 p7 RNA同様、UA間でのみ切断されていることがわかった。また切断端もHIV-1同様に塩酸により開環した断片ではなくアルカリ処理した断片と同じ移動度を示したため、2',3'-cyclic phosphateであることが示された。これらの切断はUをGへ変化させると極度に切断が減少し、UをCへ変化させCAを作らせると同様に切断が生じたため、UAまたはCA特異的に起こる切断であり、これもHIV-1 p7と同じであることが判明した。Topoisomerase IのRNAライゲースを欠くミュータント(R488A, K532A)の発現によりルシフェラーゼRNAのコピー数はGM-CSF AREを3'側に有する場合に限り、著明に減少することが判明した。

D. 考察

FRETイメージングは、これまでの生化学的手法と比較して、情報伝達に関わる分子の

活性化に関わる時空間情報を個々の細胞で、生きたままで観察することができるという利点を有している。PC12細胞におけるRac1の活性化はすでに生化学的手法で行われており、NGF添加直後にRac1の活性が上昇することが示されている。しかし、この単一細胞レベルでのFRETイメージングにより、NGF処理後にRac1とCdc42とが間歇的に活性化と不活性化を起こしていることが初めて観察できた。この観察が、Rac1やCdc42の恒常的活性化型変異体も、優勢劣性変異体もともに神経突起伸展を阻害することを説明できるだろう。このように、FRETイメージングは細胞内情報伝達と形態変化との関係を明らかにするのに非常に有用な方法である。ただし、FRETイメージングにおける光毒性はしばしば神経突起の伸展を阻害するし、細胞によってはRaichuプローブのフォールディングがうまくいかないことがあるなど、さまざまな面での改良を今後も続ける必要がある。MAPKの一つERKのプローブは、予想に反して、ERKの活性を直接にモニターするのではなく、ERKとその活性化因子MEKとの結合をモニターするものとなった。しかし、MEKからの解離はERKの活性化と非常によく相関するので、このモニターを用いてERKの活性化を間接的にではあるが検出できることがわかった。今後、このモニターを用いて、細胞増殖を制御する因子群の薬剤スクリーニング系を開発する予定である。

CrkIIのチロシンリン酸化酵素の意義には二つの考えがある。ひとつはCrkIIのY221をリン酸化されると、CrkIIのSH2およびSH3に結合している分子は解離し、CrkIIを介する信号伝達は終結するという考え、もうひとつはCrkIIのリン酸化は単にネガティブフィードバックを司っているわけではなく、むしろ信号伝達に必須であるという考えである。この問題の解答を与えるために、今回、KAEDEを使うことにより、生細胞でのCrkIIの動態を追った。これにより、細胞接着斑におけるCrkIIの置換速度は2分、と非常に早く、細胞接着斑が安定した構造ではなく、CrkIIの結合と解離を繰り返している構造であることがわかった。CrkIIのリン酸化部位を欠損するとこの交換速度が遅くなるので、CrkIIのリン酸化はCrkII細胞接着斑から離脱するのに必要であることが考えられる。このことはCrkIIが細胞接着斑から離脱することによりシグナルをOFFにするのみならず、あらたな場所へ新たな信号伝達分子を運びやすくするというように考えれば、細胞運動などには正の効果をもたらすことも考えられるので、以前のCrkIIの意義に関する相反する二つの考えも、CrkIIの細胞接着斑への結合と解離の速度という点から説明可能であるかもしれない。

一方、CrkIIを高度にリン酸化するc-Ablは慢性骨髄性白血病の原因遺伝子の産物でもあることから、細胞の異常な増殖の制御に関わりがあることが察せられる。また、増殖因子による細胞への刺激は、最終的に細胞の増殖や分化を来すため、その刺激の行方には細胞質におけるさまざまな細胞増殖に関わりのある制御機構があると言える。Crkに非常に相同性の高い蛋白CrkL (Crk like)は、この慢性骨髄性白血病の細胞においてもっともチロシンリン酸化を受けている蛋白である。このことはAblによる癌化にCrkファミリー蛋白が非常に重要な働きをしていることを示すものであり、Crkリン酸化のメカニズムを知ることがシグナル伝達経路の理解を基盤としたさらなるガン治療薬の開発の可能性を持ち、また、細胞内における均衡保持への理解から、よりシグナル伝達経路への知見が豊富になり今後の研究への寄与も期待できるだろう。

今回得られたHIVトポイソメラーゼ活性に関する結果を簡単にまとめるとRNAのステムループはtopoisomerase Iの認識する構造でありHIV-1のRNAゲノムもその例外ではない。ステムループRNAのループ部分のCAまたはUAは切断しやすい。しかしATPの存在下にtopoisomerase Iは再結合させ修復させることができるということである。この機構は標的細胞でのcDNA合成時に必要となる。これらの背景と今回得られた、GM-CSF AREのデータからHIV-1 RNA同様、情報伝達により発現が調節される因子のRNA安定性制御機構にもtopoisomerase IのRNAライゲース活性が関与していると推測された。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。

E. 結論

RhoファミリーG蛋白の活性をモニターする分子プローブを用いて、神経突起伸展過程でのRhoファミリーG蛋白の活性化を画像化することに成功した。また、細胞増殖のキレギュレーターであるMAPKの一つERKの活性化モニターを開発した。これらのプローブは今後、癌化や感染症の治療薬開発のための薬剤スクリーニングに用いることが期待される。

蛍光波長の転換が可能なKAEDE蛋白を用いてCrkII蛋白の動態を追跡することに成功した。これらのプローブは、すでに松田らが報告したPicchu蛋白とともにCrkII蛋白の生理的意義の解析のみならず、薬剤スクリーニングにも応用できると考えられる。HIV-1のゲノムRNAは発芽と共にニック生じるがtopoisomerase IのRNAライゲース活性によっ

て修復されると考えられた。情報伝達によって安定性が左右されるサイトカインなどの細胞内mRNAとHIV-1複製は共通の機構によって制御されていることが想定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoki, K., Nakamura, T., Matsuda, M. (2004) Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 713-719.
2. Kurokawa, K., Itoh, R. E., Yoshizaki, H., Ohba, Y., Nakamura, T., and Matsuda, M. (2004) Co-activation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 1003-1010.
3. Ohba, Y., Kurokawa, K., Matsuda, M. (2003) Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J.* **22**, 859-869.
4. Yoshizaki, H., Ohba, Y., Kurokawa, K., Itoh, R. E., Nakamura, T., Mochizuki, N., Nagashima, K., Matsuda, M. (2003) Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.* **162**, 223-232.
5. Nakajima, N., P. Ionescu, Y. Sato, M. Hashimoto, T. Kuroita, H. Takahashi, H. Yoshikura, and T. Sata. 2003. In Situ Hybridization AT-Tailing with Catalyzed Signal Amplification for Sensitive and Specific in Situ Detection of Human Immunodeficiency Virus-1 mRNA in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. *Am J Pathol* **162**: 381-389
6. Shoya, Y., K. Tokunaga, H. Sawa, M. Maeda, T. Ueno, T. Yoshikawa, H. Hasegawa, T. Sata, T. Kurata, W.W. Hall, B.R. Cullen, and H. Takahashi. 2003. 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 U S A* **100**: 8442-8447
7. Watanabe, I., T.M. Ross, S. Tamura, I. Ichinohe, T. Ito, H. Takahashi, H. Sawa, J. Chiba, T. Kurata, T. Sata, and H. Hasegawa. 2003. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused hemagglutinin. *Vaccine* **21**: 4532-4538
8. Takahashi, H., H. Sawa, H. Hasegawa, K. Nagashima, T. Sata and T. Kurata. 2004. Topoisomerase I dissociates human Immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) reverse transcriptase from genomic RNAs. *Biochem Biophys Res Commun* **313**:1073-1078

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

G. 知的所有権の取得状況

該当無し

平成15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16年9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