

変異ラス導入線維芽細胞に内在するRas-GTPase活性タンパク質1のノックダウンによるイノシトール4リン酸依存的な受容体作働性Ca<sup>2+</sup>流入の抑制

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9475">http://hdl.handle.net/2297/9475</a>

## 変異ラズ導入線維芽細胞に内在する Ras-GTPase 活性タンパク質1の ノックダウンによるイノシトール4リン酸依存的な 受容体作働性 Ca<sup>2+</sup>流入の抑制

金沢大学大学院医学研究科生理系神経情報物性学講座 (主任: 東田陽博教授)

高橋 博 人

マウス NIH/3T3 線維芽細胞ではブラジキニン刺激にตอบสนองしてイノシトール1,3,4,5-四リン酸 [inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate, Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub>] が生成される。これに対して変異 *ras* で形質転換した NIH/3T3 細胞 (DT 細胞) ではブラジキニン刺激により Ca<sup>2+</sup>流入が増加し、ひいては Ca<sup>2+</sup>オシレーションを誘起する。DT細胞内に Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> を導入すると、ブラジキニンで刺激しない場合でも Ca<sup>2+</sup>流入の増加が再現できた。最近、Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> の受容体として Ras-GTPase 活性タンパク質1 [Ras-GTPase activating protein 1, GAP1] が同定された。本研究は、GAP1がイノシトール1,4,5-三リン酸 (inositol 1,4,5-trisphosphate, Ins (1,4,5) P<sub>3</sub>) 依存的な容量性 Ca<sup>2+</sup>流入にではなく、Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> 依存的な受容体作働性 Ca<sup>2+</sup>流入に関わっているか否かを検討した。まず、GAPIIIのアンチセンス cDNA を DT 細胞へ導入し、GAPIIIの発現レベルを抑えた。この細胞でブラジキニン誘発性 Ca<sup>2+</sup>オシレーションおよび Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> の細胞内導入で起きる細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇や Ca<sup>2+</sup>流入の阻害に成功した。これらの結果は、フォスフォリパーゼCと共役しているブラジキニン受容体 (B<sub>2</sub>) の下流で作用している信号伝達系の中で Ras-GAP が Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> 結合タンパクとして位置し、受容体作働薬刺激に関連した Ca<sup>2+</sup>流入に関わっているということを示している。

**Key words** Ras-GAP, non-capacitative Ca<sup>2+</sup> influx, bradykinin, Ca<sup>2+</sup> oscillation, antisense DNA

フォスフォリパーゼCに共役している受容体を作働薬で刺激するとジアセलगリセロールとイノシトール1,4,5-三リン酸 [inositol 1,4,5-trisphosphate, Ins (1,4,5) P<sub>3</sub>] を産生する。Ins (1,4,5) P<sub>3</sub> はさらにイノシトール1,3,4,5-四リン酸 [inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate, Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub>] やイノシトールポリリン酸へと変換される<sup>1)</sup>。Ins (1,4,5) P<sub>3</sub> は細胞内 Ca<sup>2+</sup>貯蔵庫から Ca<sup>2+</sup>動員を引き起こし、この動員による Ca<sup>2+</sup>貯蔵庫の枯渇が細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入を引き起こす<sup>2)3)4)</sup>。一方、Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> が Ca<sup>2+</sup>流入を引き起こすことがウニ卵<sup>5)</sup>、線維芽細胞<sup>6)7)</sup>、上皮細胞<sup>8)</sup>、そしてリンパ細胞<sup>9)</sup>において報告されている。このような Ca<sup>2+</sup>流入には、Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> から Ins (1,4,5) P<sub>3</sub> への変換が関与すると考えられていて、Ca<sup>2+</sup>貯蔵庫の状態とは無関係であるとされている(非容量性 Ca<sup>2+</sup>流入)<sup>10)11)</sup>。このように Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> はセカンドメッセンジャーとして機能していて、受容体作働薬刺激(受容体活性化型)による Ca<sup>2+</sup>流入を引き起こす可能性が考えられる。ところが、このような Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> 依存的な非容量性 Ca<sup>2+</sup>流入機構についてはまだよく理解されていない<sup>12)13)</sup>。

最近、Ras-GTPase 活性タンパク質 (GTPase-activating protein, GAP) 1<sup>m</sup> <sup>14)~17)</sup>、GAPIII<sup>18)</sup>、p42<sup>IP1</sup>/セントアウリン- $\alpha$  <sup>19)</sup>、そして GAP1<sup>IP4BP</sup> <sup>20)~22)</sup> などいくつかの Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> 結合型タンパク

質が同定されている。これらのタンパク質は Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> が高親和性に結合するプレックストレイン相同性 (pleckstrin homology, PH) ドメイン<sup>23)~25)</sup> という共通のモジュールを有している。GAPIII、GAP1<sup>m</sup>、GAP1<sup>IP4BP</sup> は p120GAP など他の GAP と区別されている<sup>26)~28)</sup>。GAP は Ras や Rap1 などの低分子量 G タンパクを活性化型 (GTP 結合) から不活性化型 (GDP 結合) へと変換する GTPase 活性を促進し、これら低分子量 G タンパクを負に制御している<sup>15)22)29)30)</sup>。GAP1<sup>IP4BP</sup> はヒトの血球細胞から、GAP1<sup>m</sup> と GAPIII はラットとマウスの脳から単離され、お互いに高い相同性を示した。

我々はかつて、細胞膜電位を -40mV より過分極側にすると Ca<sup>2+</sup>流入の増加が起こることをマウス NIH/3T3 細胞で示した<sup>6)7)10)11)</sup>。この Ca<sup>2+</sup>流入は Ca<sup>2+</sup>を細胞外から定常的に移行させ、細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度をある規定レベルへと維持している。ブラジキニンを細胞外から作用させたり Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> を細胞内に導入することによって起こる Ca<sup>2+</sup>流入は、癌化した *ras* で形質転換した上皮癌細胞 (DT細胞) において劇的に増加し、脱感作を起こすことなく長時間に渡って維持される。この結果、ブラジキニンは時間単位で継続される間欠的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>上昇 (Ca<sup>2+</sup>オシレーション) を *ras* で形質転換した線維芽細胞に引き起こ

平成11年11月26日受付, 平成12年3月14日受理

Abbreviations: FCS, fetal calf serum; GAP, GTPase activating protein; GFP, green fluorescent protein; Ins (1,4,5) P<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trisphosphate; Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub>, inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate; SOS, son of sevenless; Trp, transient receptor potential

す<sup>63)</sup>。細胞膜Ca<sup>2+</sup>移行の役割について同様の証拠が*rap1*で形質転換した細胞でも報告されている<sup>32)33)</sup>。また我々はDT細胞およびNIH/3T3細胞の粗膜分画でIns (1,3,4,5) P<sub>4</sub>が単一の結合定数を持って結合すること、そしてDT細胞がGAP1<sup>IP4BP</sup>のRNAを発現することを確認した<sup>34)</sup>。

最近行われた形態学的研究において、GAP1<sup>IP4BP</sup>は細胞膜表面に位置しており、GAP1<sup>IP4BP</sup>は細胞質と核の周辺部分にだけ存在していることが確認された<sup>29)</sup>。このことは、GAP1<sup>IP4BP</sup>が細胞膜表面で機能していることを示唆している。そこでGAP1<sup>IP4BP</sup>とCa<sup>2+</sup>調節機構の関連を検討することにした。ところが、GAP1<sup>IP4BP</sup>はヒトではクローニングされていたがマウスではまだクローニングされていなかった。そこで、すでにクローニングされているGAP1ファミリーの中でもマウスGAPIIIがヒトGAP1<sup>IP4BP</sup>と高い相同性を示したことから(アミノ酸レベルで86%)、我々はGAPIIIをGAP1<sup>IP4BP</sup>のマウス相同遺伝子と仮定し、GAPIIIとCa<sup>2+</sup>調節機構との関わりをマウス線維芽細胞で検討した。

本研究では、GAPIIIがCa<sup>2+</sup>流入に関与するという直接的な証拠を得るために、DT細胞に内在するGAP1の発現を抑制する目的でアンチセンス法を用いて検討した。

## 材料および方法

### I. 細胞培養と遺伝子導入

親株マウスNIH/3T3細胞、*v-k1-ras*形質転換型NIH/3T3細胞(DT)、そして遺伝子導入DT細胞はダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, Gibco, Rockville, USA)に10%牛胎児血清(fetal calf serum, FCS, Gibco)を加え37℃、10%CO<sub>2</sub>の濃度で育成した<sup>6)</sup>。マウスGAPIII(U20238)のcDNA断片(ヌクレオチド1696-2496)は二つのプライマー(sense: 5'CGGGATCCCGAGAAGGGACCCCAAGAGCATA-3', antisense: 5'-GGAATTCATGGGTGGAGATCTCAGACTGCTG-3')を利用してRT-PCR法で増幅した。このPCR生産物は*Bam*HIと*Eco*RI制限酵素で消化し、pBluescript II KS (+)(Stratagene, La Jolla, USA)由来の2.9 kb *Bam*HI/*Eco*RI断片と接着して、これをpBlue-GAPIIIとした。このpBlue-GAPIIIを*Eco*RI/*Not*I(アンチセンス作成用)か*Bam*HI/*Eco*RI(センス作成用)で制限酵素消化後、図1Aで示すGAPIIIのC末をコードする部位を含むcDNA断片をpcDNA3(Invitrogen, Carlsbad, USA)由来の*Eco*RI/*Not*Iもしくは*Bam*HI/*Eco*RI制限酵素で消化した5.4 kb断片とそれぞれ制限酵素処理部位が等しいもの同士で接着し、それぞれをpcDNA3GAPIIIAS(アンチセンス)、pcDNA3GAPIIIS(センス)とした(図1A)。次に、これらの安定型発現株を樹立するため、700 μg/mlのジェネティシン(Sigma, St. Louis, USA)を含む培地で培養した。10-12日後、十分隔離されたコロニーを単離した。

### II. 共焦点像と形態学的な解析

グリーンフルオロセントプロテイン(green fluorescent protein, GFP)をN末に配した融合タンパク質として発現させるために、二つのC2ドメイン(1-250アミノ酸)を除くGAPIIIをコードしているDNA断片(図1B)を理化学研究所の福田光則博士および東京大学医科学研究所の御子柴克彦教授より分与していただいた。それをpEGFP-C1(Clontech, Palo Alto, USA)の*Bgl*II/*Eco*RI制限酵素部位へ挿入した。構築されたプラスミド

(pEGFPmv3GAPIII Δ C2)は、硝子カバースリップ上に培養してあるDT細胞にリポフェクタミン(Gibco)を使って一過性に導入した。導入三日後、細胞をアルゴン-イオンレーザーを搭載した共焦点顕微鏡(Carl Zeiss, CLSM-410, Esslingen, Germany)を用いて解析した。GFP蛍光像は、励起波長488 nm及び、長波長透過レーザー選択フィルター515 nmを利用して採取し、デジタルデータとしてコンピュータに保存した。25 cm<sup>2</sup>のプラスチック製の皿に培養したDTもしくはDTGIIAS-16細胞の位相差像を通常の顕微鏡を利用して得た。

### III. RNAプロットハイブリダイゼーション解析

遺伝子導入、非導入DT細胞からの全RNA調製は以前と同様の方法を利用した<sup>34)</sup>。全RNA(15 μg)は、1%アガロースフォルムアミドゲルで分離し、ゼータプローブナイロン膜(Bio-Rad, New York, USA)に電気泳動的に転写した。アンチセンス法で利用したcDNA断片を<sup>32</sup>Pでランダムプライマー法を用いて標識しGAPIIIプローブとした。また別に、18sリボソームRNA(ribosomal RNA, rRNA)のプローブとして、オリゴヌクレオチドを合成し、[γ-<sup>32</sup>P]ATPでT<sub>4</sub>ポリヌクレオチドキナーゼを利用して標識した。RNAが添付された膜は、18s rRNAの直上で切断した。18s rRNAが添付されている膜は18sリボソームのプローブと、GAPIIIが添付されている膜はGAP1に対するプローブとそれぞれハイブリダイゼーションを行った。膜は0.1 X SSCで50℃、20分、二回洗浄し、Fuji BAS 1000イメージプレート(富士フィルム、東京)に一日感光した。

### IV. Ras-GTPase活性の測定

RasへのGTP結合およびGTPase活性の測定はGibbsら<sup>35)</sup>の方法に従って行われた。0.5 mM Ha-Ras(Sigma)を0.5 mM [α-<sup>32</sup>P]GTP(3000 Ci/mmol; DuPont NEN)とL溶液[100 mMリン酸緩衝液(pH 6.8), 0.5 mM EDTA, 0.5 mg/ml牛血清アルブミン, 0.5 mMジチオトレイトール(dithiothreitol, DTT)]中で30℃、15分反応させた。非結合の[α-<sup>32</sup>P]GTPはマイクロコン10(Millipore, Bedford, USA)で除去した。[α-<sup>32</sup>P]GTP結合型Rasはタンパク質量450 μgのDTもしくはDTGIIAS-16細胞の粗抽出液と100 μlの容積中で反応させた。反応は10倍容量の水冷却したS溶液(20 mM Tris [pH 8.0], 100 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT)を加えて停止させた。この停止液中には抗ラス抗体(Y13-259, Oncogene Science, Uniondale, USA)を結合したプロテインG-セファロースレジン(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)を含んでいた。4℃で40分間転倒混和させた後、そのレジンを氷冷却したW溶液[S溶液に0.5%ノニドットP-40(ナカライテスク株式会社、京都)を加えた溶液]で4回洗浄した。レジンからヌクレオチドを遊離するためにE溶液(10 mM EDTA, 0.5% SDS)中で70℃、5分加熱した。その上澄を薄層クロマトグラフィー用プレート上で1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>の泳動溶液中、2時間展開した。そのプレートをFuji BAS 1000イメージプレート(富士フィルム)に感光し、GTPとGDP量をNIHイメージを用いて定量的に解析した。

### V. 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度とMn<sup>2+</sup>流入の測定

#### 1. 記録準備

培養皿はカバーガラス(40×50 mm, No1 thickness, マツナミ)の上に、内径19 mm、外径25 mmのシリコンチューブを7 mmに切断して、これを市販のシリコン充填剤で接着させることで自家作製した。十分に乾燥させてから、この中をFCSを含む培養液(10% FCS/DMEM)で充たした。ここに細胞を1~1.5×

$10^2$  cells/mm<sup>2</sup>になるように加え、翌日実験を行った。細胞をDMEMで1回洗浄し、5 mM fura-2アセトキシメチルエステル (fura-2 acetoxymethyl ester, fura-2AM, 同仁, 東京) を含む1% FCS/DMEMに変換し37°C, 45分間CO<sub>2</sub>インキュベーター中に放置した。ブラジキニンマイクロペットによって記録溶液へ直接滴下した。イノシトールポリリン酸はパッチ電極を通して自然拡散的に細胞内へ導入した。上記の培養皿と3M KClを満たした容器とを寒天ブリッジにて電気的に架橋した。さらに記録溶液中に置いた銀-塩化銀電極を介して下記の増幅器に接続した。記録溶液の温度を一定に保つために、上記の皿を乗せた顕微鏡台下に電熱線を敷き巡らし、直流電源 (PS-41XM, Daiwa, 大阪) を介して保温した。温度感知性プローブ (511, 日機装ワイエスアイ株式会社, 東京) と温度感知器 (YSI72A, 日機装ワイエスアイ株式会社) を利用して記録溶液中の温度を33~35°Cに保持した。実験台の周辺を金網張りの衝立で遮り、これを接地した。さらに交流雑音の原因となりうる測定周辺機器[実験台, 倒立顕微鏡 (オリンパス, 東京), オシロスコープ (V-212, VC-6020, 日立, 東京), 刺激発生装置 (DPS-165B, Dia Medical System, 東京), マイクロマニピレーター (Leitz, Wetzlar, Germany), 記録計 (RJG-4124, 日本光電, 東京)] を接地した。

## 2. Ca<sup>2+</sup>測光

膜電位を固定した状態での細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化およびMn<sup>2+</sup>流入の測定にはfura-2に対応の倒立型落射顕微鏡 (IMT-2, オリンパス) を用いた。接眼レンズに15倍, 対物レンズに20倍を用い, 中間変倍率を1.5倍とした結果, 450倍で透過観察を行った。Ca<sup>2+</sup>測定装置には, フォトマルを用いたスポット測光装置 (OSP-3, オリンパス) を用いた。

単一細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度測定でfura-2による2波長励起/1波長 (510 nm) 測光を行った。波長340 nmで励起した時に発生する蛍光は細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度増加に伴い増大し, 380 nmでは逆に減少する。Ca<sup>2+</sup>流入を測定する際には, 340 nmおよび380 nmのフィルターを励起装置に設置し, この蛍光強度比(I 340 nm/I 380 nm)を測定し, 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を二つの蛍光強度から算出した。

また10~20個の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化をArgus-50/CA (浜松フォトニクス, 静岡) にて解析した。蛍光は340nmと380 nmのフィルターが連続的に交換可能な装置およびビデオカメラ (model 2400-08, 浜松フォトニクス) を用いて解析を行った。この二つの蛍光強度 (I 340 nm/I 380 nm) に対する比率をCa<sup>2+</sup>濃度の変化とした。この方法は主に細胞株を樹立するために実験初期に用いた。

## VI. 膜電位固定

fura-2を加えた細胞でのパッチ膜電位固定は, ホールセルパッチクランプ法で行った。細胞は35°Cに保温してあるCa<sup>2+</sup>溶液 [2 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM 塩化テトラエチルアンモニウム, 5 mM CsCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM グルコース, 25 mM HEPES (pH 7.3), 0.1 μM テトロドトキシン] で灌流した。2段プラーで引いて作製したパッチ電極 (G.1.5, 成茂, 東京) は記録溶液 [150 mM CsCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>ATP, 0.1 mM fura-2, 10 mM HEPES (pH 7.2)] で充たされており, 電極のDC抵抗はこの記録液で充たすことにより8-16 MΩに維持された。細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が80-100 nMとなる細胞を実験に採用した。電極が細胞表面と密着した状態で, 電極側から陰圧をかけて吸引すると,

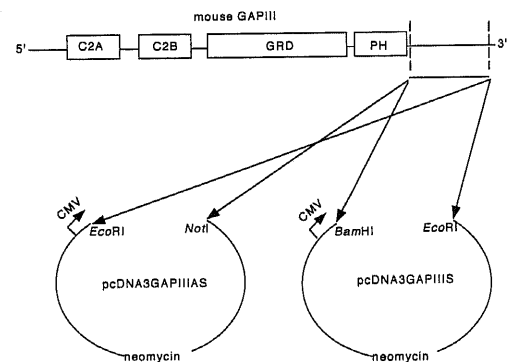
この間にギガシールが形成される。さらに吸引することで細胞膜が破れホールセルとなる。細胞は単一電極の膜電位固定増幅器 (Axoclamp 2A, Axon Instruments, Foster City, USA) を利用して膜電位を固定した。

## 成 績

### I. アンチセンスDNAを導入したDT細胞におけるGAPIII発現の減少

GAPIIIをアンチセンス (pcDNA3GAPIIIAS) およびセンス (pcDNA3GAPIIIS) 方向に哺乳動物細胞発現用ベクターに組み込んだDNA, そして発現ベクター (pcDNA3) を導入したDT細胞のそれぞれから15, 5, 3個のコロニーを得た。それらの細胞において, <sup>32</sup>Pで標識したcDNAプローブを用いたノーザンブロット法でGAPIIIのRNA含有量を評価した。RNA定量の内部コントロールとして18srRNAを用い, これに対する相対値で転写産物の比較を行った (図2A)。GAPIIIのアンチセンスDNAを導入したDT細胞から, 4.2 kbのGAPIII転写産物が野性型と比

### A



### B

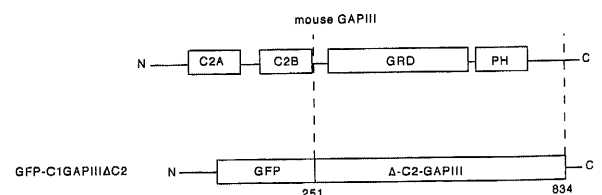


Fig. 1. Construction of plasmid vectors used in an antisense strategy and a chimera of green fluorescent protein (GFP) fused GAPIII. (A) Mouse GAPIII is constructed with 4 modules, including C2A, C2B, GRD (GTPase related domain), and PH (pleckstrin homology). The non-conserved C-terminal region of mouse GAPIII was subcloned into pcDNA3 containing a neomycin resistant gene at an antisense orientation (pcDNA3GAPIIIAS) or a sense orientation (pcDNA3GAPIIIS). DT cells were transfected with each plasmid, following which neomycin-resistant clones were selected. In the clones transfected with pcDNA3GAPIIIAS, antisense GAPIII RNA, which is transcribed under control of a CMV (cytomegalovirus) promoter, tries to prevent endogenous GAPIII expression. (B) Mouse GAPIII (amino acids 251-834) excluding C2 domains was expressed as a fusion to the N-terminus of GFP-C1GAPIII Δ C2.

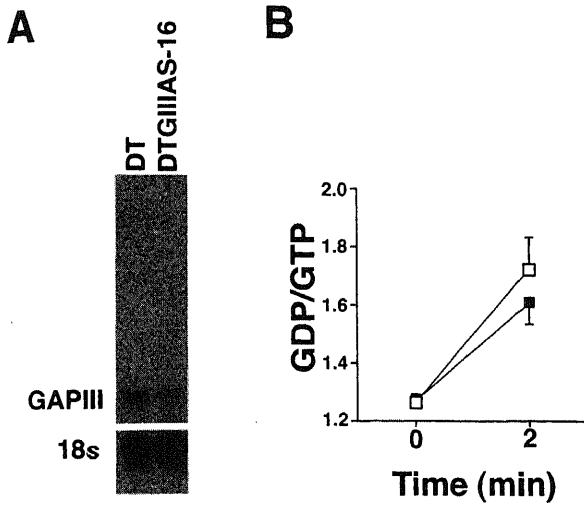


Fig. 2. Reduced expression of the GAPIII transcripts and GTPase activity in antisense-transfected DT cells. (A) Total RNA prepared from DT or DTGIIAS-16 cells was separated on a 1% agarose-formaldehyde gel and transferred to a membrane. The same membrane was used for hybridization with <sup>32</sup>P-labeled GAPIII (upper) and 18s (lower) probes. (B) [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] GTP labeled Ha-Ras was immunoprecipitated, mixed with DT and DTGIIAS-16 cell homogenates. GTPase assay was stopped by adding S buffer at 0 and 2 min. Released [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] GTP was developed on a CM-sepharose TLC in 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> for 2 hr. Ratio of GDP over GTP is plotted. Each point shows the  $\bar{x}$  from 12 cells; Bars, SE; Significantly different from values at GDP/GTP ratio of 2 min in DTGIIAS-16 cells, \*\* $p < 0.05$ .

較して63%±2% ( $\bar{x}$ ±SEM, n=3)まで減少したクローンが一つ得られた。センスDNA (DTGIIIS-2) およびベクター (DTDNA-3)を導入することで得られたクローンのGAPIII転写産物は野性型DT細胞と同じレベルを示した。

アンチセンス導入株と野性型DT細胞におけるRasに対するGTPase活性を [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] GTPを用いて測定した。アンチセンス導入株のRas-GTPase活性は、野性型DT細胞と比較して18.3±2.1% (n=12)抑制された(図2B,  $p < 0.05$ )。GAPIIIのRNAレベルの減少と対比すると、Ras-GTPase活性の抑制は充分でないと考えられる。これはGAPIII以外のGAPが存在しているか、もしくはDT細胞中のRasが抗GTPase活性を示すためにRas-GTPase活性が過小評価されている可能性が考えられる。

次に、GFPと融合させたキメラGAPIII (GFP-GAPIII)を作成し(図1B)、これを用いてDT細胞におけるGAPIIIの細胞内分布を調べることにした。図3Aに示されるように、GFP-GAPIIIの蛍光は細胞表面に分布し環状を呈していた。DT細胞ではGAPIIIは細胞膜表面に主に存在することが確認できた。

位相差顕微鏡を用いて野性株とアンチセンス導入株の間の形態学的な違いを観察した。DT細胞は両極に広がる二つの細い突起を持った紡錘型を呈した(図3B-a)。これに対して、DTGIIAS-16細胞では三本以上の突起を有し、強く培養皿に付着し、親型のNIH/3T3細胞と相似な形態を呈していた(図3B-b)。細胞がより密集した場所ではDT細胞は細胞の集積したフォーカスを形成した。一方、DTGIIAS-16細胞ではフォーカスは確認されなかった。このようにDTGIIAS-16細胞に導入されたアンチセンスGAPIIIはDT細胞の持つ線維芽細胞として特有の形態からより正常な線維芽細胞へと回復させた可能性が考えられた。さらに、アンチセンス導入株では増殖率が幾分減少した(集団倍加率, DTGIIAS-16細胞: 16.5時間 (n=2), 野性型

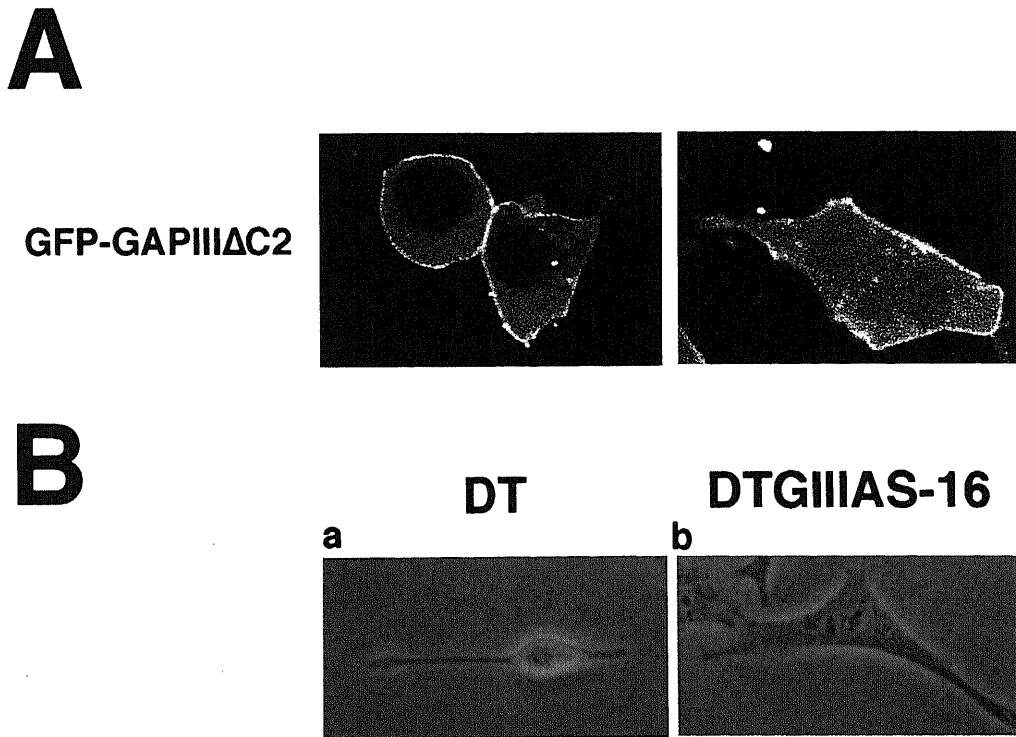


Fig. 3. Visualization of green fluorescent protein (GFP) in DT cells and morphological comparison between DT and DTGIIAS-16 cells. (A) DT cells were transiently transfected with GAPIII mutant cDNAs. At 72 hr after transfection, confocal microscopical images show two example of expression of GFP-GAPIII  $\Delta$  C2. (B) Phase contrast images are showing as representative single DT (a) and DTGIIAS-16 (b) cell.

DT細胞：14.2時間 (n=2)。

## II. GAPIII 発現の減少がブラジキニン誘発性 $Ca^{2+}$ オシレーションに及ぼす影響

我々は、GAPIII の発現抑制が細胞の  $Ca^{2+}$  濃度や  $Ca^{2+}$  オシレーションにどのように影響をおよぼすかを調べた。fura-2 で前処理してある野性株、ベクター導入株、アンチセンス導入株の刺激前の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 (60~70 nM) は、対照の NIH/3T3 細胞の持つ  $Ca^{2+}$  濃度と同じであった。ブラジキニンの投与はマイクロピペットで行い、1 ml の記録溶液に 10  $\mu$ M のブラジキニンを 25  $\mu$ l 添加して最終濃度が 250 nM になるようにした。その直後に一過性の細胞内  $Ca^{2+}$  上昇がすべての細胞株で認識された (図4)。これは、 $Ca^{2+}$  貯蔵庫からの Ins (1,4,5)  $P_3$  依存的な  $Ca^{2+}$  放出と考えられる。DTGIIAS-16 細胞におけるこの最初の細胞内  $Ca^{2+}$  上昇の最高値は他の四つの細胞と比較して差がなかった。これは Ins (1,4,5)  $P_3$  依存的で細胞内  $Ca^{2+}$  上昇を誘起するようなブラジキニン受容体の発現やその下流にある信号伝達系が遺伝子導入によって影響されなかったことを示している。

一方、連続した一過性の  $Ca^{2+}$  上昇 ( $Ca^{2+}$  オシレーション) を示すような表現型は細胞の種類に特異的であった。250 nM のブラジキニンにより誘発された  $Ca^{2+}$  オシレーションはすべての野性型 DT 細胞 (n=28) で観察された。以前の報告<sup>9</sup>と同様に、その  $Ca^{2+}$  オシレーションは 30 分に 5~10 回連続した。同様の

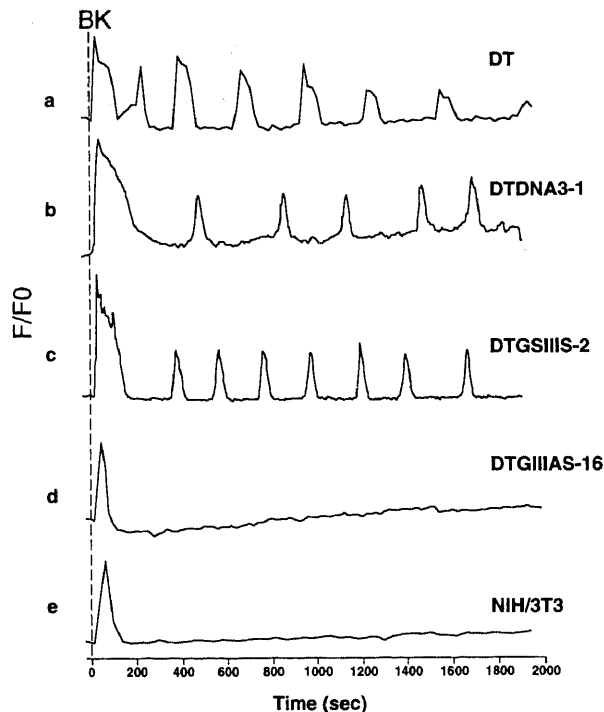


Fig. 4. Bradykinin-induced changes in cytosolic  $Ca^{2+}$  concentrations in parental NIH/3T3 cells, ras-transformed NIH/3T3 (DT) cells, and various types of DT cells transfected with GAPIII-related DNAs. These cells were preloaded with fura-2AM. Fluorescence changes were measured as described under Experimental Procedures. 25  $\mu$ l of 10  $\mu$ M bradykinin (final concentration 250 nM) was added at dashed lines in a DT cell (a), a mock-transfected cell (DTDNA3-1, b), a GAPIII-sense transfected cell (DTGSIIS-2, c), a GAPIII-antisense transfected cell (DTGIIAS-16, d) and an NIH/3T3 cell (e).

$Ca^{2+}$  オシレーションは、ベクター導入株 (図4b) やセンス導入株 (図4c) でも確認され、オシレーションの平均頻度はベクター導入株で  $0.166 \pm 0.006$  回/分 (n=12)、センス導入株では  $0.128 \pm 0.006$  回/分 (n=12) であった。

これに対して、DTGIIAS-16 細胞では 86 個の細胞すべてにおいてブラジキニン誘発性の  $Ca^{2+}$  オシレーションは観察されず

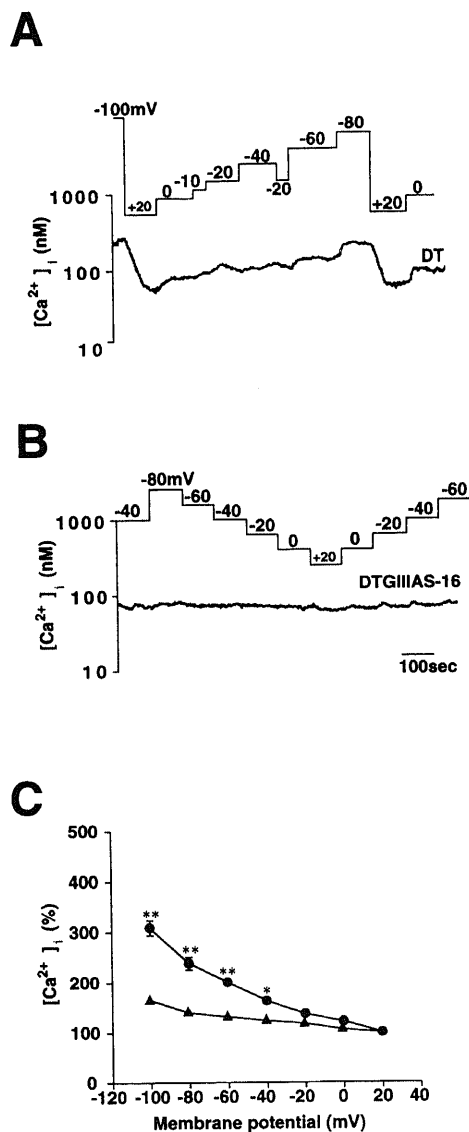


Fig. 5. Effect of various holding membrane potentials on basal  $[Ca^{2+}]_i$  and average  $[Ca^{2+}]_i$  at various membrane potentials in wild type and GAPIII-antisense transfected DT cells under voltage-clamp conditions. A and B, Upper traces of each set of records show the time course of the membrane potential. Lower traces show the fluorescence ratio for  $[Ca^{2+}]_i$  in DT (A) or DTGIIAS-16 (B) cells measured in the presence of extracellular 250 nM bradykinin. (C) The  $[Ca^{2+}]_i$  was determined at a most stable point for each voltage steps (about 2 min after stepping voltage). The  $[Ca^{2+}]_i$  level at various potentials is expressed as the percent of value at +20 mV.  $[Ca^{2+}]_i$  in wild type and DTGIIAS-16 cells stimulated with (●) or without (▲) 250 nM bradykinin. Each point shows the  $\bar{x}$  from 10 cells; Bars, SE; Significantly different from values at each membrane potential in DTGIIAS-16 cells, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

(図4d), 親株であるNIH/3T3細胞と同じ反応様式を呈していた(図4e)。これらの結果は, GAPIIIが受容体作働薬誘発性およびセカンドメッセンジャー依存的なCa<sup>2+</sup>流入により直接的に関与していることを示唆している。

### Ⅲ. GAPIII発現の減少がブラジキニン誘発性の細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇に及ぼす影響

我々は細胞膜を過分極側にすることで細胞内Ca<sup>2+</sup>が上昇すること(Ca<sup>2+</sup>流入の駆動力が増加することによる)を線維芽細胞において確認した<sup>9)</sup>。このような過分極性のCa<sup>2+</sup>流入は親株であるNIH/3T3細胞では観察されず, *ras*で形質転換したNIH/3T3細胞では顕著に増加した。この観察結果は本研究でも再現できた。250 nMのブラジキニン存在下で様々な固定膜電位における細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を測定した(図5A-C)。-40 mV以

下の過分極性電位を与えると野性型株DT細胞では細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が有意に上昇した(p<0.05, p<0.01; 図5A, C)。一方, DTGIIAS-16細胞では-80mVに固定した時でさえ明確な上昇は確認されなかった(図5B, C)。ブラジキニン非存在下では, DTGIIAS-16細胞の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は過分極性に膜電位を固定してもほとんど上昇しなかった。この反応は, ブラジキニン刺激をしない野性型DT細胞と同じであった。

### Ⅳ. GAPIIIノックダウン細胞におけるIns(1,3,4,5)P<sub>4</sub>で誘発される細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化

我々は以前, 細胞外ブラジキニン存在下で膜電位を過分極に固定すると細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が起きることを観察し, 同様のCa<sup>2+</sup>上昇がIns(1,4,5)P<sub>3</sub>ではなくIns(1,3,4,5)P<sub>4</sub>の細胞内注入によって起こることを報告した<sup>9)</sup>。これと同様の実験を

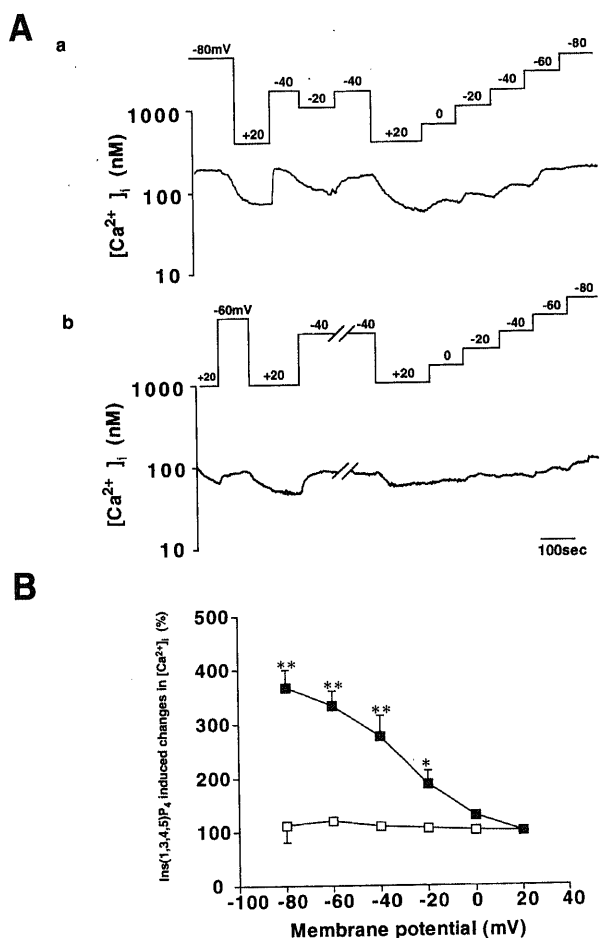


Fig. 6. Effect of intracellular application of Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> on changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> at various holding membrane potentials in control DT and DTGIIAS-16 cells under voltage clamp conditions. (A) Upper traces of each set of records indicates the time course of the voltage. Lower, changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> were recorded in a DT (a) or a DTGIIAS-16 (b) cell with the patch pipettes filled with 10 μM Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> solution. Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> was loaded into cells by diffusion from the pipettes after breaking the membrane at about 2 min from the left of each trace. (B) The data is expressed as a percentage of the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> level at +20 mV. Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> induced changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in DT (■) or DTGIIAS-16 (□) cells. Each value represents the mean of 5 cells. Bars, SE; Significantly different from values at the same membrane potential in DTGIIAS-16 cells, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

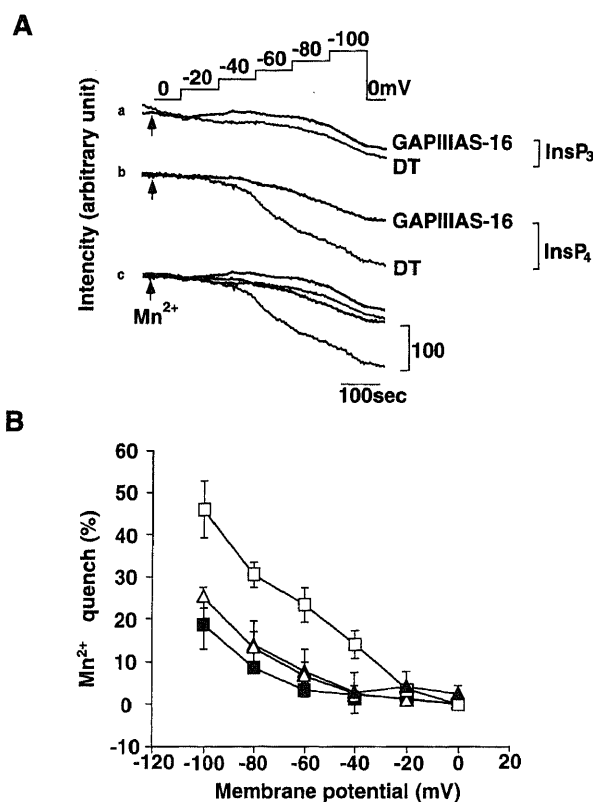


Fig. 7. Relationship between Mn<sup>2+</sup> quenching and holding membrane potential in DT cells and GAPIII or GAP1m antisense-transfected DT cells injected with Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> or Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>. (A) The top trace shows membrane potentials in voltage-clamp conditions. Traces show the time course of Mn<sup>2+</sup> quenching measured at excitation wave length of 360 nm in arbitrary units. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (a) or Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (b) were injected into two of each DT or DTGIIAS-16 cell at 2 min before each trace through patch pipettes filled with solutions containing each isomer at 10 μM. 200 μM Mn<sup>2+</sup> was extracellularly applied to the cells at the time indicated by the arrows (Mn<sup>2+</sup>). Superimposed traces (c) are also shown. (B) Five similar experiments for Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (□, △) and for Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (■, ▲) yield the membrane potential dependency curves in DT (□, ■) and DTGIIAS-16 (△, ▲) cells. Mn<sup>2+</sup> quenching is represented as percentage of the value at 0 mV. Bars, SE; The symbols indicate significant differences between DT cells and DTGIIAS-16 cells, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

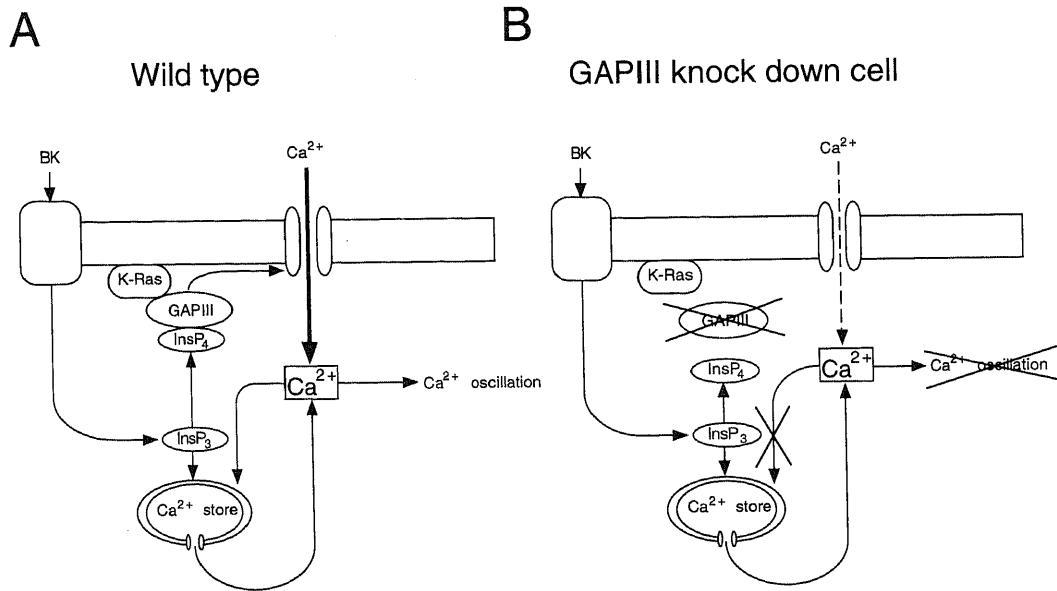


Fig. 8. Models for bradykinin-receptor operated and Ins (1,3,4,5)  $P_4$ -involved  $Ca^{2+}$  influx in wild-type and GAP1 knockdown DT cells. (A) Extracellularly applied bradykinin stimulates B2 bradykinin receptors (B2), results in Ins (1,4,5)  $P_3$  formation (Ins $P_3$ ). Ins (1,3,4,5)  $P_4$  (Ins $P_4$ ) is converted from Ins (1,4,5)  $P_3$  and binds to GAP1 (GAP1). On the other hand, oncogenic Ras (K-Ras) is also activated after bradykinin stimulation, whose pathway is omitted from this scheme. Then, molecular interaction between GAP1 with Ins (1,3,4,5)  $P_4$  and Ras may lead to open putative  $Ca^{2+}$  influx channels (paired open circles). This  $Ca^{2+}$  influx is larger and maintained longer, which may trigger  $Ca^{2+}$  oscillations via  $Ca^{2+}$  induced  $Ca^{2+}$  release mechanism in wild type ras-transformed NIH/3T3 fibroblast cells. (B) In contrast, transfection of GAP1 antisense DNA suppress expression of GAP1 (crossed out). As a consequence, in GAP1 knockdown cells (B),  $Ca^{2+}$  influx is inhibited which fails to induce  $Ca^{2+}$  oscillation.

GAP1 ノックダウン細胞で試みた。10  $\mu$ M Ins (1,3,4,5)  $P_4$  をパッチ電極から加えた野生型DT細胞とセンス導入株では細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が細胞膜電位を過分極側に固定することで観察された (図 6A-a)。一方、DTGIIAS-16細胞内に Ins (1,3,4,5)  $P_4$  を注入すると膜電位を過分極側に固定した場合でさえも細胞内  $Ca^{2+}$  濃度にはほとんど影響を示さなかった (図 6A-b)。膜電位 +20mV を基底値にとり -80mV の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を百分率で表すと、野生型DT細胞では  $365 \pm 35\%$  ( $n=5$ ) の上昇率を示し、アンチセンス導入株では  $111.8 \pm 31.3\%$  ( $n=5$ ) の上昇率を示した (図 6B)。また、この差は統計的に有意であった ( $p < 0.01$ )。

#### V. GAP1 ノックダウン細胞における $Ca^{2+}$ 流入の減少

ブラジキニンや Ins (1,3,4,5)  $P_4$  で引き起こされる過分極性の細胞内  $Ca^{2+}$  上昇は細胞外の  $Ca^{2+}$  が非存在下の場合は誘起されないことから<sup>6)</sup>、この反応が細胞膜を介した  $Ca^{2+}$  流入であることを示している。さらに、 $Ca^{2+}$  分子の流入を  $Mn^{2+}$  クエンチで確認した。 $Mn^{2+}$  クエンチは、 $Mn^{2+}$  分子が細胞内に入り込む際に  $Ca^{2+}$  流入チャンネルを共有することを利用している。我々は以前、250 nM のブラジキニンで作用させた野生型DT細胞において 0.25 mM  $Mn^{2+}$  添加後、細胞膜を過分極にすることで蛍光強度が減少することを確認した<sup>7)</sup>。ただし、この減少はブラジキニンを作用させない場合と比較して有意差は認められなかった。

同じような  $Mn^{2+}$  クエンチの増強は野生型DT細胞に Ins (1,3,4,5)  $P_4$  を細胞内注入することで引き起こされた (図 7A-b, B)。このような Ins (1,3,4,5)  $P_4$  の細胞内注入による  $Mn^{2+}$  クエン

チングの増加は DTGIIAS-16細胞では認められなかった (図 7A-b, B)。これに対して Ins (1,4,5)  $P_3$  の細胞内注入による蛍光の減少は野生型DT細胞やアンチセンス導入株細胞では観察されなかった (図 7A-a, B)。

#### 考 察

本研究で、*ras* で形質転換した NIH/3T3 細胞に内在する GAP1 をアンチセンス法によって発現レベルを抑えることに成功し、このことが結果的にブラジキニン刺激による  $Ca^{2+}$  オシレーションを阻害することを示した。この  $Ca^{2+}$  オシレーションは  $Ca^{2+}$  流入によって維持されるという報告がある<sup>67)</sup>。さらに GAP1 をノックダウンすることでブラジキニンや Ins (1,3,4,5)  $P_4$  によって引き起こされる細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を抑制できると期待し、予想通りの結果を得た。 $Ca^{2+}$  分子と同じ  $Ca^{2+}$  チャンネルを介して流入する  $Mn^{2+}$  による蛍光減少を  $Ca^{2+}$  流入の指標として観察し、GAP1 ノックダウン細胞でこの蛍光減少が抑制されることが示された。これらの結果は GAP1 ファミリーが Ins (1,3,4,5)  $P_4$  受容体として Ins (1,3,4,5)  $P_4$  依存的で、かつ受容体作動薬誘発性の  $Ca^{2+}$  流入に関与していると考えられる。今回の結果は、GAP1 が非容量性  $Ca^{2+}$  流入で重要な役割をしているという初めての分子的な証拠である。

本研究でDT細胞とアンチセンス導入株との形態学的な違いを観察した。Ras-GAPはRasの負制御因子として働いているにも関わらず、GAPをノックダウンしたDT細胞では健全な線維芽細胞の表現型を示し、決して癌化が進行した様相は認められなかった。DT細胞に内在するGAP1のノックダウンは皮膚癌



の状態から親株であるNIH/3T3細胞様の表現型へ回帰したように見受けられた。これらの結果は、Ras-GAPがCa<sup>2+</sup>流入を調節することで癌化様の形質転換に正に貢献していることを示唆するものであり、GAPは抗癌剤の新しい標的となり得る可能性が考えられる。

マウス線維芽細胞にGAPIIIとGAP1<sup>m</sup>の両方が存在していることを核酸レベルで確認したが、予備実験として作製した抗体の力価が低いため内在性のGAPIIIをウェスタンブロットでは確認できなかった。これはDT細胞に内在するGAPIIIタンパク質の量が少ないことを示している。アンチセンスの効果を、タンパク質レベルで評価するためにGTPaseの活性値を比較することにした。GTPase活性を測定した結果、アンチセンスの効果はRNAレベルの減少具合と比較して少なかった。これは、アンチセンスが未作用のGAPが機能を補償した結果ではないかと考えられる。また、このGTPase活性は内在するGAPの総和によるものであり、決して単一分子だけの活性を示すものではない。DTGIIAS-16細胞にはGAPファミリー間で相同性が低いC末端部位をアンチセンスとして導入した。したがって、この細胞のGTPase活性の減少はGAPIIIの発現を特異的に抑制した結果であると考えられる。さらに我々は予備的実験で定量的PCR法を行うことでDT細胞内のGAPIIIとGAP1<sup>m</sup>のRNA量を定量した。その結果、GAPIIIとGAP1<sup>m</sup>のRNA量は1:2であった。以上の結果から、アンチセンスによるGTPase活性の減少は適量であると考えられる。

我々は、マウスのGAP1<sup>m</sup>がまだ単離されていないという理由から、マウスですでに単離されているGAPIIIを本研究に利用した。マウスGAPIIIはヒトのGAP1<sup>m</sup>とアミノ酸レベルで86%の相同性を示している<sup>16)</sup>。このことはGAPIIIがGAP1<sup>m</sup>の Maus 相同遺伝子であると予想される。GAPIIIが細胞表面膜に存在しているという本研究の結果はGAP1<sup>m</sup>と同様の結果であり<sup>29)</sup>、この二つのタンパク質が機能的に相似であることを示している。一方、GAP1<sup>m</sup>は細胞質内にだけ存在していると報告されたが<sup>29)</sup>、上皮性成長因子の刺激によってGAP1<sup>m</sup>が細胞膜へと移行しフォスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸に結合する事実も報告されている<sup>30)</sup>。また、GAP1<sup>m</sup>は三量体型Gタンパクの $\alpha$ サブユニットであるG<sub>12</sub>と結合し、これがGAP1<sup>m</sup>を活性化するという事実も報告され<sup>30)</sup>、GAP1<sup>m</sup>もGAP1<sup>m</sup>と同様に細胞表面膜に存在することは否めない。GAP1<sup>m</sup>がG<sub>12</sub>とPHドメインを介して結合するという最近の知見<sup>35)</sup>を踏まえると、GAP1<sup>m</sup>だけでなくGAPIIIやGAP1<sup>m</sup>も細胞膜表面で機能している可能性が考えられる。これらの形態学的、生化学的な研究<sup>29)37)38)</sup>は細胞膜表面でGAP1ファミリーが機能していることを示唆している。

我々は以前、フォスホリパーゼCに結合するブラジキニン受容体の下流にあるチロシンリン酸化酵素の活性化とIns(1,3,4,5)P<sub>4</sub>の産生する信号伝達系が分担して、効果的にCa<sup>2+</sup>流入を制御しているという事実を示した<sup>39)</sup>。また、我々は未同定のCa<sup>2+</sup>チャンネル、Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>受容体としてGAP1、チロシンリン酸化受容体としてSOS等がRas同様MAPキナーゼカスケードの中でCa<sup>2+</sup>流入の信号伝達系を構成しているという線維芽細胞におけるモデルを提唱した<sup>40)</sup>。ブラジキニン刺激でIns(1,3,4,5)P<sub>4</sub>の産生と同時にチロシンのリン酸化が起こり、新生Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>はGAP1に結合する。Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>と結合しているすべてのGAP1はGTP結合型RasとPHドメインを介して

結合し<sup>40)</sup>、さらにそこからCa<sup>2+</sup>流入チャンネルに作用すると考えられる(図8A)。GAP1とIns(1,3,4,5)P<sub>4</sub>の結合後にCa<sup>2+</sup>チャンネルがどのように開口されるかは現時点では良く理解されていない。しかし、Ca<sup>2+</sup>流入の増加がCa<sup>2+</sup>誘発性Ca<sup>2+</sup>放出機構の活性化を介してCa<sup>2+</sup>オシレーションを誘起している可能性が考えられる。GAPIIIノックアウト細胞では、Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>産生後の時点で信号が停止し、Ca<sup>2+</sup>流入チャンネルまでこの信号が伝達されず、結果的にCa<sup>2+</sup>流入やCa<sup>2+</sup>オシレーションが阻害されると予想される(図8B)。

同じようにアンチセンス法を用いてヒトのリンパ球細胞のGAP1<sup>m</sup>をノックダウンした報告がなされた<sup>42)</sup>。この細胞では、過分極性反応(Ca<sup>2+</sup>依存性なK<sup>+</sup>チャンネルの活性化)がトロンピン刺激によるCa<sup>2+</sup>動員や貯蔵庫駆動式Ca<sup>2+</sup>流入として記録され、この反応がCa<sup>2+</sup>依存性なK<sup>+</sup>チャンネルの特異的な作用によって増加することが示された。しかし、この結果はIns(1,3,4,5)P<sub>4</sub>のK<sup>+</sup>チャンネル電流への影響が認められなかった点で本研究と相違がある。Luら<sup>42)</sup>の利用した細胞においてIns(1,3,4,5)P<sub>4</sub>のセカンドメッセンジャーとしての役割が認められなかったのは、その細胞ではCa<sup>2+</sup>依存性なK<sup>+</sup>コンダクタンスがCa<sup>2+</sup>に対して感受性が低く、Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>が誘発するCa<sup>2+</sup>流入が小さいため、Ca<sup>2+</sup>流入を起こすのに十分ではなかったと考えられる。

線維芽細胞において、Ca<sup>2+</sup>流入は膜電位を過分極側に変化させることによって電気的に増強される<sup>9)</sup>。この増加はイオン流入の駆動力が増加していると考えられている。Ca<sup>2+</sup>オシレーションやCa<sup>2+</sup>流入が-10mV付近か、もしくはそれより脱分極では全く起こらないことから、Ca<sup>2+</sup>流入チャンネルは高Ca<sup>2+</sup>透過性の特徴を持つカチオンチャンネルの性質を共有している。最近、トランジェントレセプターポテンシャル(transient receptor potential, Trp)やポリシスチン-L<sup>43)</sup>を含む幾つかの哺乳動物性のカチオンチャンネルが報告された。Trpチャンネルの中でも、Trp1<sup>44)</sup>、Trp2<sup>45)</sup>、Trp3<sup>46)</sup>、そしてTrp6<sup>47)</sup>は、容量性Ca<sup>2+</sup>流入に関与しているが、Trp5<sup>48)</sup>、Trp7<sup>49)</sup>は関与していない。Trp5に関しては容量性Ca<sup>2+</sup>流入への関与に対して反対の見解が報告されている<sup>48)49)</sup>。このように我々が仮定しているCa<sup>2+</sup>流入チャンネルの持つ非容量性の特徴に合致した幾つかのカチオンチャンネルが候補として挙げられる。

## 結 論

受容体作働性Ca<sup>2+</sup>流入におけるGAP1の役割を検証する目的で、*ras*遺伝子で癌化したNIH/3T3線維芽(DT)細胞に内在するGAPIIIの発現をそのアンチセンスDNAを用いて抑制し、この細胞でCa<sup>2+</sup>流入を測定した。

1. GAPIIIアンチセンスはDT細胞に内在するGAPIIIの転写産物の抑制ならびにGTPase活性を抑制した。
2. DT細胞において、GAPIIIが細胞膜表面に主に存在することをGFPを利用して確認した。
3. GAPIIIのアンチセンスはDT細胞を形態学的により健康な状態へと復帰させた。
4. GAPIIIアンチセンス導入株(DTGIIAS-16)細胞ではブラジキニン刺激によってCa<sup>2+</sup>オシレーションが誘発されなかった。
5. GAPIIIアンチセンス導入株細胞ではブラジキニン刺激、もしくはIns(1,3,4,5)P<sub>4</sub>の細胞内注入によって誘発されるCa<sup>2+</sup>

流入が抑制された。

6. 以上のことから, Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub>受容体としての GAPIII は Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub>をセカンドメッセンジャーとした受容体作働性 Ca<sup>2+</sup>流入の根本的役割を担っていることが明らかになった。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました金沢大学大学院細胞遺伝子学講座東田陽博教授に深甚なる謝意を表します。また, 終始直接御指導を賜りました橋井美奈子講師ならびに横山茂助教授に深謝いたします。最後に, 本研究の遂行にあたり御協力と御支援いただきました金沢大学大学院分子情報医学系細胞遺伝子学講座の各位に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197-205, 1989
- 2) Putney JJ. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11: 611-624, 1990
- 3) Furuichi T, Mikoshiba K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in the brain. *J Neurochem* 64: 953-960, 1995
- 4) Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77: 901-930, 1997
- 5) Irvine RF, Moor RM. Micro-injection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent on external Ca<sup>2+</sup>. *Biochem J* 240: 917-920, 1986
- 6) Hashii M, Nozawa Y, Higashida H. Bradykinin-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations and inositol tetrakisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> influx in voltage-clamped ras-transformed NIH/3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 268: 19403-19410, 1993
- 7) Hashii M, Nakashima S, Yokoyama S, Enomoto K, Minabe Y, Nozawa Y, Higashida H. Bradykinin B<sub>2</sub> receptor-induced and inositol tetrakisphosphate-evoked Ca<sup>2+</sup> entry is sensitive to a protein tyrosine phosphorylation inhibitor in ras-transformed NIH/3T3 fibroblasts. *Biochem J* 319: 649-656, 1996
- 8) Luckhoff A, Clapham DE. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca (2+)-permeable channel. *Nature* 355: 356-358, 1992
- 9) Guse AH, Roth E, Emmrich F. D-myo-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate releases Ca<sup>2+</sup> from crude microsomes and enriched vesicular plasma membranes but not from intracellular stores of permeabilized T-lymphocytes and monocytes. *Biochem J* 288: 489-495, 1992
- 10) Hashii M, Hirata M, Ozaki S, Nozawa Y, Higashida H. Ca<sup>2+</sup> influx gated by inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphate in NIH/3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 1300-1306, 1994
- 11) Hashii M, Hirata M, Ozaki S, Nozawa Y, Higashida H. Ca<sup>2+</sup> influx evoked by inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphate in ras-transformed NIH/3T3 fibroblasts. *FEBS Lett* 340: 276-280, 1994
- 12) Irvine RF. Inositol phosphates and Ca<sup>2+</sup> entry: toward a proliferation or a simplification? *FASEB J* 6: 3085-3091, 1992
- 13) Barritt GJ. Receptor-activated Ca<sup>2+</sup> inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling requirements. *Biochem J* 337: 153-169, 1999
- 14) Maekawa M, Nakamura S, Hattori S. Purification of a novel ras GTPase-activating protein from rat brain. *J Biol Chem* 268: 22948-22952, 1993
- 15) Maekawa M, Li S, Iwamatsu A, Morishita T, Yokota K, Imai Y, Kohsaka S, Nakamura S, Hattori S. A novel mammalian Ras GTPase-activating protein which has phospholipid-binding and Btk homology regions. *Mol Cell Biol* 14: 6879-6885, 1994
- 16) Fukuda M, Mikoshiba K. Structure-function relationships of the mouse Gap1<sup>m</sup> determination of the inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-binding domain. *J Biol Chem* 271: 18838-18842, 1996
- 17) Li S, Nakamura S, Hattori S. Activation of R-Ras GTPase by GTPase-activating proteins for Ras Gap1(m) and p120GAP. *J Biol Chem* 272: 19328-19332, 1997
- 18) Baba H, Fuss B, Urano J, Poulet P, Watson JB, Tamanoi F, Macklin WB. GapIII a new brain-enriched member of the GTPase-activating protein family. *J Neurosci Res* 41: 846-858, 1995
- 19) Kreutz MR, Bockers TM, Sabel BA, Hulser E, Stricker R, Reiser G. Expression and subcellular localization of p42<sup>PA</sup>/centaurin-alpha a brain-specific high-affinity receptor for inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in rat brain. *Eur J Neurosci* 9: 2110-2124, 1997
- 20) Cullen PJ, Patel Y, Kakkar VV, Irvine RF, Authi KS. Specific binding sites for inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate are located predominantly in the plasma membranes of human platelets. *Biochem J* 3: 739-742, 1994
- 21) Cullen PJ, Dawson AP, Irvine RF. Purification and characterization of an Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> binding protein from pig platelets: possible identification of a novel non-neuronal Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> receptor. *Biochem J* 305: 139-143, 1995
- 22) Cullen PJ, Hsuan JJ, Truong O, Letcher AJ, Jackson TR, Dawson AP, Irvine RF. Identification of a specific Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub>-binding protein as a member of the GAP1 family. *Nature* 376: 527-530, 1995
- 23) Fukuda M, Kojima T, Kabayama H, Mikoshiba K. Mutation of the pleckstrin homology domain of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficiency impaired inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding capacity. *J Biol Chem* 271: 30303-30306, 1996
- 24) Kojima T, Fukuda M, Watanabe Y, Hamazato F, Mikoshiba K. Characterization of the pleckstrin homology domain of Btk as an inositol polyphosphate and phosphoinositide binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 333-339, 1997
- 25) Lockyer PJ, Bottomley JR, Reynolds JS, McNulty TJ, Venkateswarlu K, Potter BV, Dempsey CE, Cullen PJ. Distinct subcellular localisations of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors GAP1<sup>IP4BP</sup> and GAP1<sup>m</sup> result from the GAP1<sup>IP4BP</sup> PH domain directing plasma membrane targeting. *Curr Biol* 7: 1007-1100, 1997
- 26) Fukuda M, Mikoshiba K. The function of inositol high polyphosphate binding proteins. *Bioessays* 19: 593-603, 1997
- 27) Chang JS, Kobayashi M, Wang DZ, Maruta H, Iwashita S. Two regions with differential growth-modulating activity in the N-terminal domain of ras GTPase-activating protein (p120GAP) src

- homology and Gly-Ala-Pro-rich regions. *Eur J Biochem* 232: 691-699, 1995
- 28) Scheffzek K, Lautwein A, Kabsch W, Ahmadian MR, Wittinghofer A. Crystal structure of the GTPase-activating domain of human p120GAP and implications for the interaction with Ras. *Nature* 384: 591-596, 1996
- 29) Loomis-Husselbee JW, Walker CD, Bottomley JR, Cullen PJ, Irvine RF, Dawson AP. Modulation of Ins (2,4,5) P<sub>3</sub>-stimulated Ca<sup>2+</sup> mobilization by ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub>: enhancement by activated G-proteins and evidence for the involvement of a GAP1 protein a putative Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub> receptor. *Biochem J* 331: 947-952, 1998
- 30) Bottomley JR, Reynolds JS, Lockyer PJ, Cullen PJ. Structural and functional analysis of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors GAP1 (IP4BP) and GAP1 (m). *Biochem Biophys Res Commun* 250: 143-149, 1998
- 31) Lang F, Waldegger S, Woell E, Ritter M, Maly K, Grunicke H. Effects of inhibitors and ion substitutions on oscillations of cell membrane potential in cells expressing the RAS oncogene. *Pflugers Arch* 421: 416-424, 1992
- 32) Corvazier E, Enouf J, Papp B, de Gunzburg J, Tavitian A, Levy-Toledano S. Evidence for a role of rap1 protein in the regulation of human platelet Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Biochem J* 281: 325-331, 1992
- 33) Magnier C, Corvazier E, Aumont MC, Le Jemtel TH, Enouf J. Relationship between Rap1 protein phosphorylation and regulation of Ca<sup>2+</sup> transport in platelets: a new approach. *Biochem J* 310: 469-475, 1995
- 34) Taketo M, Yokoyama S, Fukuda M, Mikoshiba K, Higashida H. Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate binding sites in control and ras-transformed NIH/3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 349-352, 1997
- 35) Gibbs JB, Schaber MD, Marshall MS, Scolnick EM, Sigal IS. Identification of guanine nucleotides bound to ras-encoded proteins in growing yeast cells. *J Biol Chem* 262: 10426-10429, 1987
- 36) Lockyer PJ, Wennstrom S, Kupzig S, Venkateswarlu K, Downward J, Cullen PJ. Identification of the ras GTPase-activating protein GAP1 (m) as a phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-binding protein in vivo. *Curr Biol* 9: 265-268, 1999
- 37) Jiang Y, Ma W, Wan Y, Kozasa T, Hattori S, Huang XY. The G protein G alpha12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain. *Nature* 395: 808-813, 1998
- 38) O'Rourke F, Matthews E, Feinstein MB. Isolation of InsP<sub>3</sub> and InsP<sub>6</sub> binding proteins from human platelets: InsP<sub>3</sub> promotes Ca<sup>2+</sup> efflux from inside-out plasma membrane vesicles containing 104 kDa GAP1<sup>IP4BP</sup> protein. *Biochem J* 315: 1027-1034, 1996
- 39) Higashida H, Hashii M, Yokoyama S, Taketo M, Hoshi N, Noda M, Zhong ZG, Shahidullah M, Minabe Y, Nakashima S, Nozawa Y. Bradykinin B<sub>2</sub> receptors and signal transduction analyzed in NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells B<sub>2</sub> receptor-transformed CHO cells and ras-transformed NIH/3T3 fibroblasts. *Prog Brain Res* 113: 215-230, 1996
- 40) Higashida H, Taketo M, Takahashi H, Yokoyama S, Hashii M. Potential mechanism for bradykinin-activated and inositol tetrakisphosphate-dependent Ca<sup>2+</sup> influx by Ras and GAP1 in fibroblast cells. *Immunopharmacology* 45: 7-11, 1999.
- 41) Inglese J, Koch WJ, Touhara K, Lefkowitz RJ. G beta gamma interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways. *Trends Biochem Sci* 20: 151-156, 1995
- 42) Lu X, Fein A, Feinstein MB, O'Rourke FA. Antisense knock out of the inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor GAP1 (IP4BP) in the human erythroleukemia cell line leads to the appearance of intermediate conductance K (Ca) channels that hyperpolarize the membrane and enhance calcium influx. *J Gen Physiol* 113: 81-96, 1999
- 43) Chen XZ, Vassilev PM, Basora N, Peng JB, Nomura H, Segal Y, Brown EM, Reeders ST, Hediger MA, Zhou J. Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature* 401: 383-386, 1999
- 44) Tsiokas L, Arnould T, Zhu C, Kim E, Walz G, Sukhatme VP. Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3934-3939, 1999
- 45) Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L. Mouse trp2 the homologue of the human trpc2 pseudogene encodes mTrp2 a store depletion-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2060-2064, 1999
- 46) Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX, Muallem S. The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell Biol* 3: 423-429, 1999
- 47) Mizuno N, Kitayama S, Saishin Y, Shimada S, Morita K, Mitsuhashi C, Kurihara H, Dohi T. Molecular cloning and characterization of rat trp homologues from brain. *Brain Res Mol Brain Res* 64: 41-51, 1999
- 48) Philipp S, Hambrecht J, Braslavski L, Schroth G, Freichel M, Murakami M, Cavalie A, Flockerzi V. A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J* 17: 4274-4282, 1998
- 49) Okada T, Shimizum S, Wakamori M, Maeda A, Kurosaki T, Takada N, Imoto K, Mori Y. Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca<sup>2+</sup> channel from mouse brain. *J Biol Chem* 273: 10279-10287, 1998

**Ras-GTPase Activating Protein 1 Knockdown Inhibits Receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx of the Inositol Tetrakisphosphate-dependent Type in ras-transformed Fibroblasts** Hiroto Takahashi, Department of Biophysical Genetics, Kanazawa University Graduate School of Medicine, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., **109**, 144 – 154 (2000)

**Key words** Ras-GAP, non-capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  influx, bradykinin;  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation, antisense DNA

#### **Abstract**

Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate (Ins (1,3,4,5)  $\text{P}_4$ ) is formed in mouse NIH/3T3 fibroblast cells in response to bradykinin. Bradykinin potentiates  $\text{Ca}^{2+}$  influx when the cells are transformed by oncogenic ras, resulting in  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. Intracellular infusion of Ins (1,3,4,5)  $\text{P}_4$  reproduces this  $\text{Ca}^{2+}$  influx potentiation. Recently, Ras-GTPase activating protein (GAP)1 has been identified as the Ins (1,3,4,5)  $\text{P}_4$  receptor. The question addressed here is whether or not GAP1 plays a role in receptor-operated and Ins (1,3,4,5)  $\text{P}_4$ -dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry, other than the inositol trisphosphate-sensitive capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  one. With antisense mouse cDNA of GAP1, we transfected the ras-transformed fibroblast (DT) cells. Bradykinin was unable to produce  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in such GAP1 knockdown cells. Furthermore, the increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  rise and  $\text{Ca}^{2+}$  entry elicited by both bradykinin and Ins (1,3,4,5)  $\text{P}_4$  were suppressed. These results suggest that Ras-GAP1 is involved in agonist-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  entry as the Ins (1,3,4,5)  $\text{P}_4$  binding protein in a signal cascade downstream of phospholipase C-coupled bradykinin receptors.