

論文の内容の要旨

論文題目 RGS-RhoGEF の $G\alpha_{12/13}$ による制御機構の解析

氏名 田邊思帆里

【序】

様々な7回膜貫通型薬物受容体刺激の情報は、三量体Gタンパク質を介して細胞内へ伝えられ、シグナル伝達ネットワークを介して生理応答を引き起こす。三量体Gタンパク質の一種である $G\alpha_{12/13}$ は低分子量Gタンパク質である Rho を活性化する。Rho は、細胞骨格系の再構築、遺伝子発現に関与し、細胞周期促進、神経突起制御などの細胞応答をひき起こす。また、Rho は RhoGEF (Guanine nucleotide exchange factor for Rho) タンパク質の DH/PH ドメインによって活性化される。一方、三量体Gタンパク質 α サブユニットに対する GAPs (guanosine triphosphatase-activating proteins)として RGS (regulator of G protein signaling)タンパク質が同定されている。RGS ドメインを持ったヒト RGS-RhoGEF タンパク質として、p115RhoGEF、LARG および PDZ-RhoGEF という三種のタンパク質がこれまでに同定されている (Fig.1)。これらの RGS-RhoGEF は RGS ドメインを介して $G\alpha_{12/13}$ タンパク質と直接相互作用し、DH/PH ドメインを介して Rho を活性化することによって、 $G_{12/13}$ タンパク質共役型受容体刺激のシグナルを、MAPK カスケード等を通じて細胞内生理応答へ導くと考えられている。

これまで PDZ-RhoGEF は細胞を用いた解析においてその $G\alpha_{12/13}$ タンパク質による活性化が示唆されてきたが、*in vitro* における直接的な活性化は観察されていなかった。そこで本研究においては、PDZ-RhoGEF をはじめとする、RGS-RhoGEF ファミリーの $G_{12/13}$ による活性制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的として解析を行った。



Fig. 1 ヒトRGS-RhoGEFファミリーのドメイン構造とアミノ酸数
ヒトRGS-RhoGEFとしてp115RhoGEF LARG PDZ-RhoGEFが同定されている。

【方法と結果】

1. Sf9 細胞を用いたタンパク質精製

RGS-RhoGEF の活性化測定には、*in vitro* の再構成系を用いた。Sf9 baculovirus 発現系を用いて recombinant タンパク質を精製しアッセイに用いた。野生型 Rho と GST-RhoGDI を共発現し、glutathione カラムを用いて精製する従来の方法においては、得られるタンパク質が 2L の Sf9 culture から約 100 μ g と低収量であり、又、RhoGDI と結合する他の低分子量 G タンパク質を共精製する可能性が考えられた。そこでこれらの問題点を改善するため、N 末端に His₆-tag を付加した RhoA (His₆-RhoA) の baculovirus を作製し、Ni-NTA カラムを用いて精製することを試みた。His₆-RhoA の virus を感染させた Sf9 細胞のペレットは溶解後超遠心し、その上清を Ni-NTA カラムに添加した。カラムを洗浄後、Imidazole を用いて溶出した。

この方法により 1L の Sf9 culture から 5mg という高収量の Rho を得ることが可能となった(Fig.2)。また、G α 13 タンパク質も同様に Sf9 細胞から精製した。Sf9 culture に、G α 13, G β ₁, His₆-G γ ₂ の baculovirus を共感染させ、回収後、Ni-NTA カラム及び hydroxyapatite カラムを用いて精製した。LARG、p115RhoGEF の recombinant タンパク質はそれぞれの baculovirus を感染させた Sf9 細胞から Ni-NTA カラムを用いて精製した。

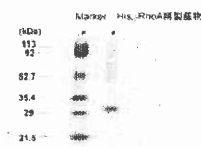


Fig.2 Sf9 baculovirus発現系を用いたHis₆-RhoAの精製
Sf9 cultureにHis₆-RhoA baculovirusを感染させ回収し、Ni-NTAカラムを用いて精製したものを SDS-PAGE後Coomassie Brilliant Blue染色した。

2. GTP- γ S binding 測定による RhoGEF アッセイ

RGS-RhoGEF は RGS ドメインを介して活性化型 G α 12/13 タンパク質と相互作用し、DH/PH ドメインを介して Rho タンパク質を活性化する。Rho の活性化は、不活性化状態の GDP 結合型から活性化型の GTP 結合型へ変換されることによりおこる。

本研究においては、RhoGEF の活性化を Rho に対する GTP γ S 結合により定量する方法を新規に開発した。従来の、Rho からの GDP 解離を定量する方法においては、Rho に [³H]-GDP を load するステップが必要であったが、GTP γ S 結合を直接定量することで、アッセイをよりシンプルなものに改良した。また、得られるシグナルの感度が上昇した。この新たなアッセイ系を用いて G α 13 タンパク質が精製 p115RhoGEF 及び LARG を活性化することが明らかとなった(Fig.3)。

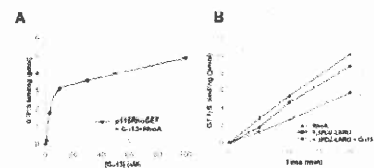


Fig.3 G α 13によるp115RhoGEF及びLARGの活性化
A G α 13はrecombinant p115RhoGEFを濃度依存的に活性化した。Recombinant G α 13はp115RhoGEF、RhoAと共に30°Cでincubationし、その活性を測定した。B G α 13はrecombinant LARGを時間依存的に活性化した。Recombinant G α 13 (30nM)はLARG、RhoAと共に30°Cでincubationを行った。

3. 免疫沈降した PDZ-RhoGEF の G α 13 による活性化

Fig.3 に示すように、p115RhoGEF および LARG の G α 13 による活性化は *in vitro* 再構成実験において観察されたが、一方で、PDZ-RhoGEF に関しては同様の *in vitro* 再構成系を用いた限りでは活性化が見られなかった。

そこで次に、PDZ-RhoGEFの活性化に対しては昆虫細胞内では誘導されない何らかの細胞内修飾が必要である可能性を想定し、RhoGEFをヒトHEK293細胞に発現させた後、免疫沈降してその活性を測定することを試みた。免疫沈降したPDZ-RhoGEFを用いてRhoGEFアッセイを行ったところ、Gα13によりPDZ-RhoGEFが活性化されることが初めて明らかとなった(Fig.4)。このことより、Gα13によるPDZ-RhoGEFの活性化にとっては何らかの細胞内修飾又は細胞内因子の必要性が考えられた。

4. RhoGEFに対するリン酸化

以前の報告により、Src tyrosine kinaseがGα12-Rho経路に関与していることや、Gα12によるLARGの活性化がTec tyrosine kinaseによるリン酸化依存적であることが示唆されている。そこでGα12/13によるRhoGEF活性化の機構を明らかにするため、G12/13、RhoGEF、Rho経路に対するSrcの関与を調べることにし、まずこれらのRGS-RhoGEFのチロシンリン酸化を検討した。各RhoGEFとSrcをHEK293細胞にco-transfectionし、免疫沈降した。PDZ-RhoGEFとLARGがSrc依存的にチロシンリン酸化され、p115RhoGEFは同じ条件下でチロシンリン酸化されないことを見出した(Fig.5)。さらに、PDZ-RhoGEFのN末端とC末端を欠損した変異体(PDZ-RhoGEFのRGS/DH/PHドメイン)は全長PDZ-RhoGEFとは異なりチロシンリン酸化されないことを見出した。このことより、PDZ-RhoGEFのSrcによるチロシンリン酸化はN末端又はC末端でおこっていると考えられる。又、SRE luciferase assayを用いてRhoの活性を測定した。Gα13とPDZ-RhoGEFを共発現させることによって上昇した活性は、Srcによって抑制されることが明らかとなった。一方、LARGの活性化はSrcによって増強される傾向が観察されたことより、各々のRhoGEFがリン酸化により細胞内で異なった制御を受けている可能性が考えられた。

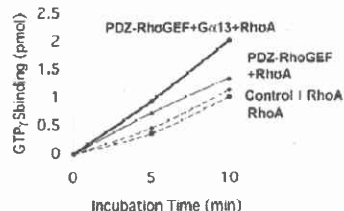


Fig. 4 Gα13によるPDZ-RhoGEFの活性化 HEK293細胞に発現させ、抗myc抗体を用いて免疫沈降したPDZ-RhoGEFはGα13により活性化された。

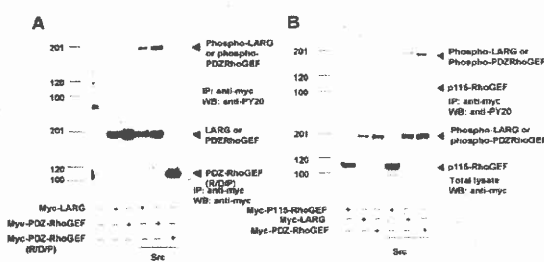
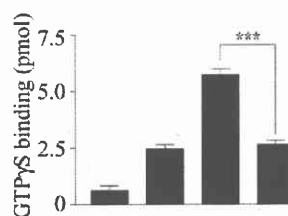


Fig. 5 Src tyrosine kinaseによるRGS-RhoGEFのリン酸化 A. Src tyrosine kinaseはPDZ-RhoGEF及びLARGをリン酸化した。PDZ-RhoGEF及びLARGをSrcとHEK293細胞に共発現させ、RhoGEFを免疫沈降後、抗リン酸化チロシン抗体にてWestern blottingを行った。B. Src tyrosine kinaseはp115RhoGEFをリン酸化しなかった。

5. $G\alpha 13K204A$ の p115RhoGEF 活性への影響

RGS ドメインはそれぞれ $G\alpha$ サブユニットに対する GAP 活性を有しているが、それらは Gai/o 、及び Gq サブファミリーに対するものが多い。RGS4 の RGS ドメインが $Gai1$ の switch I region と相互作用していることが知られている。特に Gai の 182 番目の threonine が、RGS4 の RGS ドメイン内のいくつかのアミノ酸残基との相互作用にとって重要であると考えられている。この threonine は $G\alpha s$ 及び $G\alpha 12/13$ 以外の $G\alpha$ サブユニットに保存されており、 $G12/13$ の α サブユニットにおいては 204 番目の lysine がこれに相当する。 $G\alpha 13$ の lysine を alanine に変換した変異体を用いて解析を行った。

$G\alpha 13$ (30 nM)及び $G\alpha 13K204A$ (30 nM)を recombinant の p115RhoGEF 及び RhoA と混合し、30°Cにて 10 分間 incubate して RhoGEF アッセイを行った。RhoA に対する GTP γ S binding を測定したところ、p115RhoGEF の活性は $G\alpha 13$ によって活性化されたが、 $G\alpha 13K204A$ によっては活性化されなかった(Fig.6)。よって、 $G\alpha 13$ の 204 番目の lysine は p115RhoGEF の活性化に対して重要な役割を担っているものと考えられる。



RhoA (500 nM)	+	+	+	+
p115RhoGEF (5 nM)	-	+	+	+
$G\alpha 13$ (30 nM)	-	-	+	-
$G\alpha 13K204A$ (30 nM)	-	-	-	+

Fig. 6 $G\alpha 13K204A$ によるp115RhoGEF活性への影響
 $G\alpha 13$ がp115RhoGEFを活性化したのに対し、 $G\alpha 13K204A$ はp115RhoGEFを活性化しなかった。

【まとめ】

以上のことより、 $G\alpha 13$ が、精製及び免疫沈降した p115-RhoGEF、LARG を活性化することが GTP γ S の結合を測定する新たなアッセイ法により確認された。また、HEK293 細胞より免疫沈降した PDZ-RhoGEF が $G\alpha 13$ により活性化されることが新たに明らかとなった。さらに、PDZ-RhoGEF が Src tyrosine kinase によりリン酸化されることを見出し、その活性がリン酸化によって制御されている可能性を見出した。Rho GTPase 活性化機構は各々の RhoGEF により異なり、 $G12/13$ 経路が RhoGEF のリン酸化によりさらに制御されている可能性が考えられる。

References

Tanabe S, Kreutz B, Suzuki N, and Kozasa T (2004) *Methods Enzymol.* 390, 285-294

Nakamura S, Kreutz B, Tanabe S, Suzuki N, and Kozasa T (2004) *Mol Pharmacol.* 66, 1029-1034