

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07927

研究課題名(和文) 三量体G蛋白質シグナル依存的Rho活性化因子の構造生物学的解析による機能解明

研究課題名(英文) Functional and structural biological analysis of heterotrimeric G protein signal-dependent RhoGEF

研究代表者

上田 浩 (UEDA, Hiroshi)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：50253779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：三量体G蛋白質Gサブユニットと直接相互作用し、活性化するRhoファミリー低分子量G蛋白質特異的活性化因子(RhoGEF)の1つであるPLEKHG2は、その活性中心であるDblホモロジー(DH)ドメインやpleckstrinホモロジー(PH)ドメイン以外の機能ドメインは明らかではない。本研究では、Gサブユニット以外の分子とPLEKHG2の相互作用を介した機能調節について検討し、PLEKHG2に対し、三量体G蛋白質G<sub>s</sub>サブユニットおよびチロシンキナーゼの1つであるABL1は相互作用を介して抑制的に、FHL1は、相互作用を介して活性化方向に作用することを見出した。

研究成果の概要(英文)：PLEKHG2 is a Rho family small G protein-specific guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF) which is activated by the directly interaction with heterotrimeric G protein G subunits. However, there are no functional domains other than the Dbl homology (DH) domain and pleckstrin homology (PH) domain, which are active centers, in the structure of PLEKHG 2. In this study, functional regulation via interaction between molecules other than G subunits and PLEKHG2 was investigated. The interaction between PLEKHG2 and heterotrimeric G protein G<sub>s</sub> subunit, or ABL1, attenuate the activity of PLEKHG2. On the other hand, the interaction between PLEKHG2 and FHL1 activate the activity of PLEKHG2.

研究分野：生化学

キーワード：Rho RhoGEF GPCR G蛋白質 チロシンキナーゼ チロシンリン酸化 蛋白質間相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、PLEKHG2 や ARHGEF9 などの Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質特異的活性化因子 (RhoGEF) が、三量体 G 蛋白質シグナルにより制御されることを報告していた。その中で、PLEKHG2 は、三量体 G 蛋白質  $G\beta\gamma$  サブユニットと直接相互作用し、活性化され、下流で Rho ファミリー低分子量(Rho)である Rac 及び Cdc42 を活性化を介して、細胞伸展を制御する。さらに、F-actin と相互作用では、その活性が抑制される。このように、PLEKHG2 は、他の RhoGEF と同様に種々の細胞内シグナルにより、制御される可能性が示唆された。一方、多くの RhoGEF について、その立体構造の詳細は、明らかになっておらず、PLEKHG2 についても、その立体構造についての詳細は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、種々の生体分子と結合することが明らかになった PLEKHG2 について、他の分子との相互作用による活性制御機構の解析結果を通して、細胞機能を明らかにするとともに、PLEKHG2 及び PLEKHG2 と他分子との複合体の立体構造を明らかにすることを目的としていた。本研究により、細胞内における RhoGEF の役割を明確にすると共に、細胞形態変化に関わるがんなどの疾病に対する創薬研究に結び付けられることを期待していた。

## 3. 研究の方法

- (1) 各種遺伝子の調製：本研究で使用した各種 RhoGEF 変異体遺伝子は、各 RhoGEF の野生型(WT)を鋳型にし、PCR を行い、それらを発現ベクターに組み込み調製した。各種 SFK の WT は、ヒト大脳 cDNA ライブラリーから、PCR を行い、発現ベクターに組み込み調製した。また、それらの各種変異体も、PCR を行い調製した。
- (2) 細胞培養及び遺伝子導入：HEK293 細胞は、10%ウシ血清含有ダルベッコ変法イーグ

ル培地(DMEM)を用い、通常の方法により、培養を行った。遺伝子導入は、ポリエチレンイミンにより行い、一定時間後、遺伝子導入操作を行った細胞は、飢餓状態にし、さらに一定時間後に、各種解析に用いた。

- (3) 各種遺伝子転写活性測定：Rho 活性の指標の1つである serum response element (SRE) 依存的遺伝子転写活性 (SRE 活性) や、Gs シグナル活性化の指標のひとつである cAMP response element (CRE) 依存的遺伝子転写活性 (CRE 活性) を、dual luciferase reporter gene assay システムを用い測定した。
- (4) 免疫沈降：細胞内での各種蛋白質の相互作用を解析するため、各種抗体を用い免疫沈降後、イムノプロットを行い解析した。
- (5) 細胞の免疫染色：各種抗体を用い、常法に従い、免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡により、観察し、解析した。
- (6) *in vitro*でのタンパク質相互作用解析：大腸菌内から各種 GST 融合蛋白質を調製し、それらと、各種遺伝子を導入した細胞ライセートを混合し、グルタチオンビーズを用い、pull-down し、その沈殿をイムノプロットし、各種蛋白質間の相互作用の有無を解析した。

## 4. 研究成果

- (1) PLEKHG2 と Gas との相互作用による制御  
Gs による PLEKHG2 誘導性 SRE 活性の抑制：HEK293 細胞において、PLEKHG2 と Gs の恒常的活性化型変異体 (QL 体) を共発現させた場合、PLEKHG2 誘導性 SRE 活性が抑制されることを見出していた。さらにその詳細に検討した結果、この抑制は、細胞をコレラ毒素処理することでも見られた。一方、Gs シグナルの指

標である CRE 活性は、PLEKHG2 のみを発現させた細胞では、その上昇が見られず、PLEKHG2 と G<sub>s</sub>QL 体を共発現させた場合には上昇した。さらに、この SRE 活性抑制は、Gs 共役型受容体野 1 つである TGR5 刺激によっても確認でき、生理的条件下でこの反応が起こっている可能性が示唆された。また、G<sub>s</sub> シグナルで活性化される PKA について、PKA の恒常的活性化型変異体 (CA 体) を用い検討した。その結果、PLEKHG2 と PKACA 体とを共発現させた細胞では、PLEKHG2 誘導性 SRE 活性抑制は見られなかった。

G<sub>s</sub> と PLEKHG2 の相互作用：で見られた SRE 活性抑制が、PLEKHG2 と G<sub>s</sub> の直接的な相互作用により起こっている可能性を調べるため、PLEKHG2 と G<sub>s</sub>QL 体を共発現させた細胞を用い、免疫沈降を行った。その結果、PLEKHG2 と G<sub>s</sub> が細胞内で相互作用していることが示唆された。さらに、PLEKHG2 の各種変異体を用い、免疫沈降を行った結果、PLEKHG2 の活性を担う DH ドメイン付近のアミノ酸配列と G<sub>s</sub> が相互作用することが明らかになった。また、この相互作用が、*in vitro* で見られるかどうかについて、PLEKHG2 の DH ドメインを含むアミノ酸配列を含むポリペプチドの GST 融合蛋白質を使用し検討した結果、やはり、*in vitro* においても相互作用することが明らかになり、G<sub>s</sub> との直接的な相互作用が、PLEKHG2 の活性を抑制することが明らかとなった。

- (2) PLEKHG2 と FHL1 の相互作用とその機能  
PLEKHG2 の相互作用分子としての FHL1 の同定：現在まで、いくつかの

RhoGEF が、細胞内の種々のシグナルにより制御されることが報告されている。そのことから、RhoGEF の 1 つである PLEKHG2 も、三量体 G 蛋白質 G $\beta\gamma$  や F-actin 等の他の細胞内分子によりその活性が調節されることから、PLEKHG2 の配列を bait とし、酵母 Two-hybrid システムを用い、さらに相互作用する分子の同定を試みた。その結果、FHL1 が PLEKHG2 の DH ドメインを含むアミノ酸配列を含む領域と相互作用する分子として同定された。

FHL1 との相互作用による PLEKHG2 の制御：FHL1 は、PLEKHG2 の DH ドメイン近傍と相互作用することにより、PLEKHG2 の活性を上昇させることが明らかとなった。また、Neuro2a 細胞を使用した細胞染色の結果、その相互作用が細胞突起伸展を促進させることが明らかとなった。

- (3) PLEKHG2 と ABL1 の相互作用とその役割

PLEKHG2 と ABL1 とのチロシンリン酸化非依存的相互作用：PLEKHG2 は、SRC により 489 番目のチロシンがリン酸化され、そのリン酸化チロシンを介して、ABL1 及び PI3K の調節サブユニットと相互作用することを過去に報告した。その際、ABL1 はチロシンリン酸化非依存的にも相互作用することを示唆する結果を得ていた。そこで、その相互作用にそれぞれの蛋白質のどのアミノ酸配列が寄与しているのかについて検討を行った。その結果、ABL1 の C 末端側のアミノ配列の領域と PLEKHG2 の DH ドメイン付近を含むアミノ酸配列の領域が相互作用すること明らかになった。

ABL1 の PLEKHG2 機能に対する影響：  
ABL1 と PLEKHG2 を共発現させた細胞

において、PLEKHG2 依存的 SRE 活性の抑制がみられた。この SRE 活性抑制は、で示した ABL1 の C 末端側のアミノ配列の領域との共発現でも見られる。また、PLEKHG2 の DH ドメイン付近を含むアミノ酸配列の領域と ABL1 の WT との共発現細胞でも見られる。これらのことから、この ABL1 の C 末端領域が、PLEKHG2 の活性を担う DH ドメイン付近に結合することを介して、PLEKHG2 の活性を抑制することが示唆された。今後、この相互作用の細胞機能について検討する必要があると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- (1) Shibata, S., Furuta, K., Oh-Hashi, K., Ueda, H., Kiuchi, K., and Hirata, Y. Prevention of oxytosis-induced c-Raf down-regulation by (arylthio)cyclopentenone prostaglandins is neuroprotective. *Toxicology*. 390, 2017, 83-87 査読有
- (2) Nishikawa, M., Sato, K., Nakano, S., Yamakawa, H., Nagase, T. and Ueda, H., Specific activation of PLEKHG2-induced serum response element-dependent gene transcription by four-and-a-half LIM domains (FHL) 1, but not FHL2 or FHL3. *Small GTPases*. 10, 2017, 1-6 査読有
- (3) Sugiyama, K., Tago, K., Matsushita, S., Nishikawa, M., Sato, K., Muto, Y., Nagase, T. and Ueda, H., Heterotrimeric G protein Gas subunit attenuates PLEKHG2, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, by direct interaction. *Cell. Signal*. 32, 2017, 115-123 査読有
- (4) 上田浩, 三量体 G 蛋白質により調節される Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質特異的グアニンヌクレオチド交換因子., 生化学, 88, 2016, 416-418 査読有
- (5) Sato, K., Kimura, M., Sugiyama, K., Nishikawa, M., Okano, Y., Nagaoka, H., Nagase, T., Kitade, Y. and Ueda, H., Four-and-a-half LIM Domains 1 (FHL1) Protein Interacts with the Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor PLEKHG2/FLJ00018 and Regulates Cell Morphogenesis. *J. Biol. Chem*. 291, 2016, 25227-25238 査読有
- (6) Taniguchi, K., Sakai, M., Sugito, N., Kuranaga, Y., Kumazaki, M., Shinohara, H., Ueda, H., Futamura, M., Yoshida, K., Uchiyama, K. and Akao, Y., PKM1 is involved in resistance to anti-cancer drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 473, 2016, 174-180 査読有
- (7) Taniguchi, K., Sakai, M., Sugito, N., Kumazaki, M., Shinohara, H., Yamada, N., Nakayama, T., Ueda, H., Nakagawa, Y., Ito Y, Futamura, M., Uno, B., Otsuki, Y., Yoshida, K., Uchiyama, K. and Akao, Y., PTBP1-associated microRNA-1 and -133b suppress the Warburg effect in colorectal tumors. *Oncotarget*. 7, 2016, 18940-18952 査読有
- (8) Kumazaki, M., Shinohara, H., Taniguchi, K., Ueda, H., Ryo, A. and Akao, Y., Understanding of tolerance in TRAIL-induced apoptosis and cancelation of its machinery by  $\alpha$ -mangostin, a xanthone derivative., *Oncotarget*, 6, 2015, 25828-25842 査読有
- (9) Muto, Y., Guindon, S., Umemura, T., Kōhidai, L. and Ueda, H., Adaptive evolution of formyl peptide receptors in mammals., *J. Mol. Evol.*, 80, 2015, 130-141 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

小林知世、西川将司、中野駿、石川奈津子、大脇千智、山川央、長瀬隆弘、上田造 (岐阜大院生命工、岐阜大院連創、かずさ DNA 研) FYN による Rho 活性化因子 PLEKHG1 の活性制御機構、生命科学系学会合同年次大会 神戸ポートアイランド 神戸市 2017 年 12 月 8 日

中野駿、浅岡里奈、西川将司、石川奈津子、大脇千智、山川央、長瀬隆弘、上田造 (岐阜大工、岐阜大院連創、かずさ DNA 研) EphB2/SRC シグナルを介した Rho 活性化因子 DBS のチロシンリン酸化、生命科学系学会合同年次大会 神戸ポートアイランド 神戸市 2017 年 12 月 8 日

西川将司、中尾拓、中野駿、石川奈津子、大脇千智、山川央、長瀬隆弘、上田造 (岐阜大院連創、岐阜大工、かずさ DNA 研) 非受容体型チロシンキナーゼ ABL1 による Rho 活性化因子 PLEKHG2 の活性制御と核内移行、生命科学系学会合同年次大会 神戸ポートアイランド 神戸市 2017 年 12 月 8 日

石川奈津子、大脇千智、西川将司、中野駿、杉山剛志、山川央、長瀬隆弘、上田造 (岐阜大院自然科学、岐阜大院連創、岐阜薬大、かずさ DNA 研) 三量体 G 蛋白質シグナルによる低分子量 G 蛋白質 RhoF 活性制御機構、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2017 鈴鹿医療科学大学 鈴鹿市 2017 年 11 月 26 日

大脇千智、石川奈津子、西川将司、中野駿、山川央、長瀬隆弘、上田造 (岐阜大院自然科学、岐阜大院連創、かずさ DNA 研) p21-activated kinase 1 による Rho 活性化因子 PLEKHG1 の抑制機構、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2017 鈴鹿医療科学大学 鈴鹿市 2017 年 11 月 26 日

西川将司、中尾拓、中野駿、石川奈津子、大脇千智、山川央、長瀬隆弘、上田造 (岐阜大院連創、岐阜大工、かずさ DNA 研) 非受容体型チロシンキナーゼ ABL1 による Rho 活性化因子 PLEKHG2 の活性制御、日本生化学会中部支部例会・シンポジウム 名古屋市立大学 2017 年 5 月 20 日  
中野駿、浅岡里奈、西川将司、石川奈津子、大脇千智、山川央、長瀬隆弘、上田造 (岐阜大工、岐阜大院連創、かずさ DNA 研) EphB2/cSrc を介したチロシンリン酸化による Rho 活性化因子 Dbs の活性化機構、日本生化学会中部支部例会・シンポジウム 名古屋市立大学 2017 年 5 月 20 日

西川将司、杉山和恵、佐藤克哉、山川央、長瀬隆弘、上田造 (岐阜大院連創、かずさ DNA 研) 三量体 G 蛋白質による Rho 活性化因子 PLEKHG1 の活性制御、第 39 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 横浜市 2016 年 12 月 1 日

吉田泰徳、本山ユミ、榊原清美、今枝孝夫、喜多村徳昭、柴田綾、池田将、長瀬隆弘、上田造 (岐阜大工、岐阜大院連創、豊田中研、かずさ DNA 研) 新規短鎖脂肪酸特異的受容体としての嗅覚受容体の同定と解析、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2016 長良川国際会議場 岐阜市 2016 年 10 月 30 日

中野駿、西川将司、長瀬隆弘、上田造 (岐阜大工、岐阜大院連創、かずさ DNA 研) 三量体 G 蛋白質による Rho 活性化因子 PLEKHG3 の活性制御、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2016 長良川国際会議場 岐阜市 2016 年 10 月 30 日

小林知世、石川奈津子、大脇千智、貝増聖嘉、西川将司、長瀬隆弘、上田造 (岐阜大工、岐阜大院連創、かずさ DNA 研)

Src ファミリーチロシンキナーゼ Fyn による PLEKHG1 のチロシンリン酸化と活性制御、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2016 長良川国際会議場 岐阜市 2016 年 10 月 30 日

杉山和恵、多胡憲治、武藤吉徳、長瀬隆弘、上田浩(岐阜大院連創、岐阜大 工、自治医大、医、かずさ DNA 研) Rho 特異的活性化因子 PLEKHG2 の Gαs との相互作用による制御機構、BMB2015 神戸市 2015 年 12 月 3 日

板津美穂、杉山和恵、長瀬隆弘、上田浩(岐阜大工、岐阜大院連創、かずさ DNA 研) Sec14 domain-Spectrin repeat 含有 Rho 活性化因子群の三量体 G タンパク質との相互作用とその活性化、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2015 名古屋市 2015 年 11 月 1 日

中尾拡、杉山和恵、長瀬隆弘、上田浩(岐阜大工、岐阜大院連創、かずさ DNA 研) Rho 活性化因子 PLEKHG2 の ABL1 及び cSrc との相互作用とその生理機能、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2015 名古屋市 2015 年 11 月 1 日

稲垣里奈、高橋圭太、井上直樹、長瀬隆弘、上田浩、杉山剛志、(岐阜薬大・かずさ DNA 研、岐阜大工) Rho グアニンヌクレオチド交換因子 KIAA1209 による Toll 様受容体シグナル増強作用 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2015 名古屋市 2015 年 11 月 1 日

浅岡里奈、田代圭、中野駿、吉田泰徳、杉山和恵、長瀬隆弘、上田浩(岐阜大工、岐阜大院連創、かずさ DNA 研) cSrc による Rho 活性化因子 Dbs のチロシンリン酸化と活性制御、日本病院薬剤師会東

海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2015 名古屋市 2015 年 11 月 1 日

秋元奈央、西井さあら、長谷川拓也、高橋圭太、井上直樹、長瀬隆弘、上田浩、杉山剛志 (岐阜薬大・かずさ DNA 研、岐阜大工) Vsm-RhoGEF(Ephexin5)による TRIF 依存的シグナルの増強メカニズム 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2015 名古屋市 2015 年 11 月 1 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[https://www1.gifu-u.ac.jp/~mb3\\_ulab/](https://www1.gifu-u.ac.jp/~mb3_ulab/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上田 浩 (UEDA Hiroshi)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：5 0 2 5 3 7 7 9

### (2) 研究分担者

加藤 善一郎 (KATO Zenichiro)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：9 0 3 0 3 5 0 2