

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590055

研究課題名（和文） 新規 $\beta\gamma$ 依存性RhoGEFと相互作用する生体分子の同定とその生理機能の解明研究課題名（英文） Identification of novel G $\beta\gamma$ dependent RhoGEF interacting molecules

研究代表者

上田 浩 (UEDA HIROSHI)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：50253779

研究成果の概要（和文）：

これまで、我々は、種々の細胞において、三量体G蛋白質による Rho ファミリーG蛋白質の活性化機構の存在を示してきた。この機構解明には三量体G蛋白質シグナルによる Rho ファミリーG蛋白質に特異的な GTP-GDP 交換反応促進因子 (RhoGEF) の活性化機構の解明が重要であると考え、本研究ではかずさ DNA 研究所のデータベースにある RhoGEF の遺伝子クローン中、三量体 G 蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニット (G $\beta\gamma$) により活性化される RhoGEF 分子として同定した FLJ00018 と相互作用する生体分子の同定とその生理機能について解析を進めた。その結果、FLJ00018 のもつ Pleckstrin homology(PH)ドメインには、ホスファチジルイノシトール(4,5)ビスリン酸を含むいくつかのイノシトールリン脂質とホスファチジン酸が結合することが明らかになった。このことから、この FLJ00018 の活性制御にはリン脂質代謝経路が密接にかかわることが分かり、その代謝酵素であるホスホリパーゼ C やホスホリパーゼ D2 との共発現により、FLJ00018 の活性抑制が見られた。このことから、ホスファチジルイノシトール(4,5)ビスリン酸やホスファチジン酸との相互作用が活性制御に働いていることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Rho family GTPase-specific guanine nucleotide exchange factors of Dbl family regulate a variety of cellular events including cytoskeletal arrangement, signal transduction, and gene expression through activation of Rho family GTPases. FLJ00018/CLG/PLEKHG2 is a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Rho family of small GTPases and Dbl homology (DH), Pleckstrin homology (PH) domains. FLJ00018 possesses a region that binds to heterotrimeric GTP-binding protein $\beta\gamma$ subunits. This interaction activates the GEF activity of FLJ00018, and thereby enhances serum response element (SRE) dependent gene transcription and affects cell spreading. In this research project, we have examined the functional significance of the PH domain of FLJ00018. We show here that the PH domain of FLJ00018 interact to phosphoinositide containing PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ and phosphatidic acid. Phospholipase C and phospholipase D regulate FLJ00018 functions through the PH domain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：RhoGEF、三量体G蛋白質、Rhoファミリー低分子量G蛋白質、アクチン細胞骨格、遺伝子制御、細胞形態変化、GPCR

1. 研究開始当初の背景

近年、三量体GTP結合蛋白質(G蛋白質)共役型受容体の刺激により、細胞形態が制御を受けることが報告されている。この過程で、アクチン細胞骨格制御に関わることが知られている低分子量G蛋白質の一種であるRhoファミリーG蛋白質を介したシグナルが関与していることも知られている。三量体G蛋白質により、どのようにRhoファミリー低分子量G蛋白質が制御されるのかについては、RhoファミリーG蛋白質特異的に働くGDP-GTP交換反応促進因子(RhoGEF)やGTPase activating protein(RhoGAP)などの関与が考えられた。我々は、三量体G蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニット($G\beta\gamma$)により活性化されるRhoGEFの同定を試み、FLJ00018/PLEKHG2/clgを同定した。このFLJ0018は、 $G\beta\gamma$ と直接相互作用し、RhoファミリーG蛋白質の中の、RacやCdc42を活性化させることが明らかになった。しかし、その詳細な制御機構は不明であった。

2. 研究の目的

我々が同定したFLJ00018は、RhoファミリーG蛋白質の活性化に関わるDbl homology (DH)ドメインや生体膜との相互作用に関わるとされるpleckstrin homology (PH)ドメイン以外に既知のドメインはいまのところなく、どのような機序で活性制御がなされるのかについては不明であった。本研究では、PHドメインとC末端に存在するPDZドメイン含有蛋白質相互作用配列に着目し、その機能について、明らかにすると共に、その他FLJ00018と相互作用する分子について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

FLJ00018ワイルドタイプ(wt)、FLJ00018のPHドメイン欠損変異体(Δ PH)、及び、PHドメイン(FLJ00018PH)発現プラスミドを作製した。脂質代謝酵素として、ホスホリパーゼC及びホスホリパーゼDの発現プラスミドを調製した。また、FLJ00018及びFLJ00018と同様に $G\beta\gamma$ と直接相互作用し、活性化することが知られているP-Rex1のPHドメインをGST融合蛋白質として、調製するため、発現ベクターを調製し、それを用い、大腸菌からそれぞれの蛋白質を調製した。RhoGEFの活性化の指標としては、serum response element 依存的な転写活性を測定し、その上昇の度合いを指標とした。具体的には、

HEK293細胞に必要な遺伝子を共発現させ、dual luciferase assayを使用し、測定した。また、NIH3T3細胞を用い、各種遺伝子を導入した細胞におけるFLJ00018の局在等について蛍光顕微鏡を用い観察した。

FLJ00018のPHドメインがどのようなリン脂質と結合するかについて、PIP stripを用い、各種イノシトールリン脂質との相互作用について検討を行った。

4. 研究成果

(1)FLJ00018のPHドメインの機能

FLJ00018WTと $G\beta\gamma$ を共発現させた場合は、SRE活性は顕著な有意に上昇した。それに対して、FLJ00018 Δ PHでは、その活性上昇は見られず、FLJ00018WTのみを発現させた細胞で見られていた活性も認められなかった。このことから、他のRhoGEFでも言われているように、その活性にはPHドメインが必要であることが分かった。また、FLJ00018WTと $G\beta\gamma$ さらにFLJ00018PHを共発現させた細胞では、SRE活性上昇が、有意に抑制された。このことから、FLJ00018wt内にあるPHドメインの働きを、過剰に発現したFLJ00018PHが阻害することにより、活性が抑制されたと考えられた。この点からも、FLJ00018のRhoGEF活性化にはPHドメインが必要であることが示唆された。

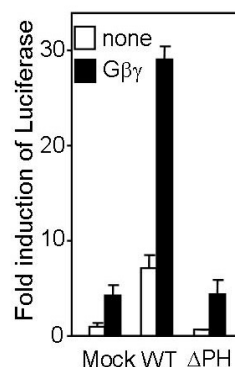


図1. PHドメイン欠損変異体(Δ PH)では、活性低下が見られる。(未発表データ)

一般的に、PHドメインは、イノシトールリン脂質と結合することが知られている。そこで、FLJ00018が持つPHドメインがどのようなイノシトールリン脂質と相互作用するのかについて、種々のイノシトールリン脂質が塗布されたPIP stripを用い検討を行った。

その結果、FLJ00018PH には、phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate(PIP2), phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate(PIP3)などが相互作用することが明らかになった。また、phosphatidic acid(PA)も相互作用することが明らかになった。一方、FLJ00018 と同様に Gβγ と直接相互作用し、活性化することが知られている P-Rex1 の PH ドメイン(P-Rex1PH)は、FLJ00018PH とは異なり、3位にリン酸基が結合したイノシトールリン脂質が主に相互作用することが明らかになった。この結果は、P-Rex1 が PIP3 依存的に活性化することと一致している。これらの結果から、FLJ00018 は、PIP2 や PA と生体膜上で相互作用することが考えられ、リン脂質代謝により、その活性が制御される可能性が考えられた。

そこで、次にイノシトールリン脂質代謝との関係を調べるため、代謝酵素としてイノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼ Cβ (PLCβ)及び PA 産生酵素としてホスホリパーゼ D の2種類にアイソザイム (PLD1 及び PLD2) との関係について検討した。その結果、FLJ00018 と PLCβ との共発現により、SRE 活性上昇が有意に抑制された。これは、細胞膜上の PIP2 が減少し、FLJ00018 と膜との相互作用が弱まったためと考えられた。さらに、PLD1 及び PLD2 のそれぞれと FLJ00018 を共発現した細胞について、PLD1 との共発現では、SRE 活性については大きな変化は認められなかった。一方、PLD2 との共発現では、SRE 活性に有意な抑制が見られた。これらの結果は、一般的に活性化型と考えられている PLD2 の存在下で、PA が産生され、その PA が FLJ00018 と相互作用することにより、SRE 活性が抑制されたと考えられた。

以上の結果から、FLJ00018 は、分子内に存在する PH ドメインを介して、生体膜に存在する PIP2 などのイノシトールリン脂質ならび PA と相互作用することにより、その RhoGEF 活性が制御される。その制御については、PLC や PLD などのリン脂質代謝酵素の活性が密接に関係していることが明らかになった。(この結果についての論文は、現在投稿準備中である。)

(2)FLJ00018 の PDZ ドメイン含有蛋白質結合モチーフの機能

FLJ00018 の C 末端には、PDZ ドメイン含有蛋白質結合モチーフに類似の構造が存在する。本研究のもう一つの研究目的として、この部位に結合する PDZ 含有蛋白質を同定することを試みた。

FLJ00018wt と 5 種類の PDZ 含有蛋白質を共発現させ、免疫沈降法により、相互作用する蛋白質の同定を試みた。その結果、PSD-95 が強く結合することが示唆された。さらに、PSD-95 と FLJ00018wt 及び Gβγ を共発現させ

た細胞での SRE 活性は、FLJ00018wt と Gβγ を共発現させた細胞に比べ、有意に減少した。この結果から、FLJ00018 の C 末端に存在する PDZ ドメイン含有蛋白質結合モチーフを介して、結合する PDZ 含有タンパク質により、FLJ00018 の活性が調節される可能性が示唆された。しかし、現在、ヒトの PDZ 含有蛋白質は、約 200 あると考えられていることから、もう少し網羅的に本当のリガンドとなる PDZ 含有蛋白質を同定する必要があると考えられ、現在検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Koike C., Numata T., Ueda H., Mori Y. and Furukawa T. TRPM1: A vertebrate TRP channel responsible for retinal ON bipolar function. *Cell Calcium* (2010) 48 95-101. 査読有

2. Koike C., Obara T., Uriu Y., Numata T., Sanuki R., Miyata K., Koyasu T., Ueno S., Funabiki K., Tani A., Ueda H., Kondo M., Mori Y., Tachibana M. and Furukawa T. TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2010) 107(1), 332-337. 査読有

3. Nemoto S., Nakamura M., Osawa Y., Kono S., Itoh Y., Okano Y., Murate T., Hara A., Ueda H., Nozawa Y., and Banno Y. Sphingosine kinase isoforms regulate oxaliplatin sensitivity of human colon cancer cells through ceramide accumulation and AKT activation. *J. Biol. Chem.* **284** 10422-10432 (2009) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 佐藤克哉、柴田裕貴、長瀬隆弘、上田浩；Gβγ と相互作用する RhoGEF, GBGEF3 の活性制御機構 (ポスター発表) [第 33 回日本分子生物学学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会 BMB2010; 2010 年 12 月 / 神戸]

2. 上田浩; 新規 GPCR シグナル依存性 Rho 活性化因子の細胞機能における役割 (口頭発表) [先端創薬医療シンポジウム; 2010 年 11 月 / 岐阜]

3. 佐藤克哉、加藤久司、高野英悟、長瀬隆弘、上田浩; Rho 活性化因子 FLJ00018 の EGF 受容体 transactivation を介した活性化機構 (ポスター発表) [第 82 回日本生化学会大会合同大会; 2009 年 10 月 / 神戸]

4. 加藤久司、佐藤克哉、高野英悟、長瀬隆弘、上田浩；Gi による Rho ファミリー低分子 G 蛋白質活性化因子の活性制御（ポスター発表）[第 82 回日本生化学会大会合同大会；2009 年 10 月／神戸]
5. 高野英悟、佐藤克哉、加藤久司、長瀬隆弘、上田浩；新規 $\beta\gamma$ 依存的 RhoA 活性化因子の Src による活性制御（ポスター発表）[第 82 回日本生化学会大会合同大会；2009 年 10 月／神戸]
6. 上田浩、中峰康揮、夏目陽子、佐藤克哉、長瀬隆弘、小原収、吉田敏；三量体 G 蛋白質 $\beta\gamma$ 依存性 RhoGEF, FLJ00018 の PDZ ドメイン結合モチーフを介する活性制御の検討（ポスター発表）[第 31 回日本分子生物学学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会 BMB2008；2008 年 12 月／神戸]

[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

http://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・准教授

研究者番号：50253779

(2) 研究分担者

坂野喜子 (BANNO YOSHIKO)

岐阜大学・医学（系）研究科（研究院）・

准教授

研究者番号：50116852