

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590073

研究課題名(和文) 三量体G蛋白質シグナル依存的Rho活性化因子のリン酸化の生理的役割

研究課題名(英文) The physiological roles of the phosphorylation of heterotrimeric G protein signal-dependent RhoGEFs

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞形態変化を制御と考えられているRhoファミリー低分子量G蛋白質特異的に働き、その活性を制御することが知られているRho活性化因子(RhoGEF)の一種であるPLEKHG2の活性制御機構の解明を目指した。特にリン酸化や蛋白質間相互作用に注目し、チロシンキナーゼの1種であるSrcによるリン酸化やEGF受容体シグナルによるリン酸化、膜リン脂質やアクチンとの相互作用などについて明らかにした。

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. In this research project, we have examined the regulation mechanisms of PLEKHG2 by phosphorylation and protein-protein interactions. We showed here that PLEKHG2 interacted with cytosolic actin or phosphoinositide containing PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ and phosphatidic acid. We showed that PLEKHG2 was phosphorylated by tyrosine kinase Src or EGF receptor signals.

研究分野：生化学

キーワード：シグナル伝達 RhoGEF Rho チロシンリン酸化 キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

我々は、過去、三量体 G 蛋白質の各種サブユニット (特に $\beta\gamma$ サブユニット) が、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質を介して、細胞伸展やストレスファイバー形成などを制御することを報告してきた。さらに、それらの制御機構を探るため、現在まで、かずさ DNA 研究所との共同研究により、三量体 G 蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットにより制御される新規の Rho 活性化因子 (RhoGEF) の同定を行ってきた。その結果、ヒト長鎖遺伝子クローンの中、PLEKHG2/FLJ00018 が $\beta\gamma$ サブユニットにより、Rac 及び Cdc42 を活性化することクローンのひとつであることを見出した。また、つい最近、RhoGEF の一種である hPEM-2/KIAA0424 が、Gs および Gq シグナルにより制御されることを見出し論文を作成中であった。一方、最近、G α の新規のエフェクターとして、TRPM1 を見出したことなども考え合わせ、 α サブユニットも含め、各種サブユニットにより直接制御される生体分子の同定が今後急がれることなどと考え合わせると、多くの RhoGEF 分子が、三量体 G 蛋白質シグナルにより直接あるいは間接的に制御される可能性があり、それらの制御機構が注目されていた。一方、RhoGEF 分子は、そのほとんどが 70~200kDa の分子量をもつ、大きな分子であり、いくつかの細胞内シグナルで同時に制御されることが報告されている。このひとつのシグナル伝達様式が、リン酸化であり、いくつかの RhoGEF 分子が、様々な経路でリン酸化されることが報告されていた。当時、我々が見出した PLEKHG2/FLJ00018 が、EGF 受容体シグナルによりリン酸化されることを見出し、三量体 G 蛋白質シグナルとは異なるシグナルにより制御されることを見出し、論文投稿準備中であった。また、FLJ00018 および他の種類の RhoGEF も $\beta\gamma$ サブユニットにより活性化されることを見出し、さらにがん遺伝子の一種である src によりチロシンリン酸化されることを見出していた。以上のことから、細胞において、三量体 G 蛋白質シグナルにより制御される RhoGEF 分子が、別のシグナル経路からのリン酸化を受けることにより、別の制御を受けることが示唆された。これらは、src によるがん化に伴う、細胞形態変化に、RhoGEF のリン酸化の関与が考えられ、これらの機構の詳細を検討することにより、新たながん化機構の発見とそれに対する新たな創薬に貢献できるものと考えていた。

2. 研究の目的

1 の背景を基に、本研究では、以下の3点について明らかにすることを目的としていた。つまり、

1) **三量体 G 蛋白質シグナル依存性 RhoGEF 分子のリン酸化部位とそのリン酸化酵素の同定**：EGF 刺激に伴う FLJ00018 のリン酸化

部位の同定とそのリン酸化を起こすリン酸化酵素の同定を行う。また、src により起こる FLJ00018 及び FLJ00261 のチロシンリン酸化部位の同定を行う。

2) **三量体 G 蛋白質シグナル依存性 RhoGEF 分子のリン酸化部位変異体を用いた各リン酸化の細胞機能における役割**：1) で同定されたリン酸化部位の各種遺伝子変異体を用い、各リン酸化部位の細胞機能における役割を明らかにする。特に、細胞伸展や増殖能に与える影響について明確にする。

3) **三量体 G 蛋白質シグナル依存性 RhoGEF 分子のチロシンリン酸化に伴う、分子間相互作用の有無とその分子の同定**：一般的に、チロシンリン酸化部位は他の生体分子との相互作用に重要な役割を果たすことが考えられている。このことから、チロシンリン酸化部位と他分子との相互作用の有無を明らかにするとともに、相互作用する分子を同定し、その相互作用の役割を明らかにすることであった。

3. 研究の方法

本研究全体を通して、Rho 活性化因子の活性化については、Rho 特異的な遺伝子転写活性として報告のある serum response element 依存的遺伝子転写活性 (SRE 活性) 等の測定、Rho 特異的な細胞形態変化の観察等により解析した。また、蛋白質リン酸化部位の特定には、分子生物学的な手法を用いアミノ酸置換などの各種変異体を利用し、解析した。また、リン酸化チロシン特異的な蛋白質の相互作用を SH2 ドメインアレイを用い解析した。

4. 研究成果

1) **PLEKHG2 の PH ドメインの脂質特異性とその重要性**：ほとんどの Dbl homology (DH) ドメインを持つ RhoGEF 分子は、DH ドメインと plekstrin homology (PH) ドメインを持つことが知られている。PH ドメインは一般的に、その分子の膜移行の制御に関わるドメインとして知られており、リン脂質特にイノシトールリン脂質に特異的に結合することが知られている。しかし、アミノ酸配列の違いにより、脂質特異性が異なっていると考えられることから、本研究では、PLEKHG2 の PH ドメインの脂質特異性について検討している。その結果、 $\beta\gamma$ 依存性 RhoGEF として知られている P-Rex1 の PH ドメインは、イノシトールの 3 位にリン酸基のついたイノシトールリン脂質に特異的に結合するのに対し、PLEKHG2 の PH ドメインは、PI(4,5)P₂ やホスファチジン酸などにも結合することが明らかにした。また、PH ドメイン欠損変異体では、PLEKHG2 による SRE 活性が有意に減少することから、PH ドメインが PLEKHG2 の RhoGEF 活性に重要な役割を持つことも明らかにした。以上のことから、PLEKHG2 は、他の RhoGEF 同様、PH ドメインを介して、細胞膜上のイノシトール

リン脂質やホスファチジン酸と相互作用し、その活性が制御されることが示唆された。(発表論文6)

2) PLEKHG2 のアクチンとの相互作用による活性抑制:本研究では、PLEKHG2 の 1-465 のアミノ酸配列を用い、酵母 Two-Hybrid 法を使用し、PLEKHG2 と相互作用する分子の同定を試みた。その結果、その分子候補として、アクチンを見出した。アクチンと PLEKHG2 を HEK293 細胞に共発現し、免疫沈降を行った結果、これら 2 分子が共沈降することが明らかになった。さらに、共発現させた細胞では、PLEKHG2 による SRE 活性が有意に減少した。また、 $\beta\gamma$ 共存下での SRE 活性も有意に減少した。これらのことから、アクチンとの結合により PLEKHG2 の RhoGEF 活性が阻害されることが示唆された。また、細胞内局在から、PLEKHG2 は、細胞内で F アクチンと相互作用していると考えられた。以上のことから、PLEKHG2 により、活性化された Rac や Cdc42 により、細胞内アクチンが F アクチンへと変換され、その F アクチンと PLEKHG2 が結合することによりこの系のフィードバック的阻害がかかる機構の存在が示唆された。(発表論文5)

3) PLEKHG2 の EphB2/Src 経路によるチロシンリン酸化と Src homology 2 ドメイン含有蛋白質との相互作用:がん細胞は、浸潤・転移能を有しており、これらの細胞運動の際、PLEKHG2 が作用することが考えられる。そこで、がん化に重要な働きをしていると考えられるがん遺伝子のひとつであり、非受容体型チロシンキナーゼの一種である Src により、PLEKHG2 がリン酸化されるかどうかについて検討を行った。その結果、Src により PLEKHG2 が 489 番目のチロシンがリン酸化されることを見出した。このとき Src はエフリン B2 受容体(EphB2)からのシグナルで制御されることが示唆された。一般的に、蛋白質のリン酸化チロシン残基は、Src homology 2(SH2)ドメインが認識し、そのドメインを持つ蛋白質と結合することが知られている。本研究では、種々の SH2 ドメインを使用した SH2 ドメインアレイを用い、この PLEKHG2 のリン酸化チロシン残基が、どの SH2 ドメイン含有蛋白質と相互作用するかを調べた。その結果、PI3 キナーゼの調節サブユニットの一つである PIK3R3 および Abl キナーゼ(ABL1)と結合することを見出した。そこで、これらがリン酸化特異的に結合するかを免疫沈降実験で調べたところ、PIK3R3 はリン酸化特異的な結合を示したが、ABL1 は非特異的に結合することが明らかになった。また、PLEKHG2 は ABL1 によってもチロシンリン酸化されることも明らかにした。今後、これらのリン酸化と相互作用にどのような生理作用があるかについて検討する必要があると考えられた。(発表論文8)

4) EGF シグナルによる PLEKHG2 のリン酸化と細胞形態制御:報告されている種々の RhoGEF は、細胞内外のいろいろなシグナルを受け制御されるとされている。われわれは、PLEKHG2 が $\beta\gamma$ シグナルを受け活性化されることを明らかにしたが、他の RhoGEF と同様に他のシグナルでも制御されることが考えられた。種々の検討の結果、PLEKHG2 は EGF 受容体刺激によりリン酸化され、活性化されることを見出した。また、このリン酸化は、EGF 受容体の下流で働く Ras/MAP キナーゼ経路によるものであり、すくなくとも 680 番目のスレオニンがリン酸化されることを見出した。また、このこのスレオニンのアラニン置換体では、EGF による Nuero2A の形態変化が抑制されることを明らかにした。これらのことから、PLEKHG2 は EGF 等の刺激による Ras/MAP キナーゼ経路により制御され、他の細胞でも細胞形態制御に関わっている可能性が示唆された。(発表論文9)

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 10 件)

1. Muto, Y., Guindon, S., Toshiaki Umemura, T., Köhidai, L., and Ueda H., Adaptive evolution of formyl peptide receptors in mammals. *J. Mol. Evol.* 80(2):130-141(2015) (査読有)
2. Sato K., Sugiyama T., Nagase T., Kitade Y. and Ueda H., Threonine 680 phosphorylation of FLJ00018/PLEKHG2, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, by epidermal growth factor receptor signaling regulate cell morphology of Neuro-2a cells. *J. Biol. Chem.* 289(14): 10045-10056 (2014) (査読有)
3. Sato K., Suzuki T., Yamaguchi Y., Kitade Y., Nagase T. and Ueda H., PLEKHG2/FLJ00018, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, is tyrosine phosphorylated via the EphB2/cSrc signaling pathway. *Cell signal.* 26(4): 691-696 (2014) (査読有)
4. Kheirollah A., Nagayasu Y., Ueda H.,

- Yokoyama S. Michikawa M. and Ito J., Involvement of cdc42/Rho kinase in apoA-I-mediated cholesterol efflux through interaction between cytosolic lipid-protein particles and microtubules in rat astrocytes. *J. Neurosci. Res.*, in press (2014) (査読有)
5. Kimura S., Sato K., Banno Y., Nagase T. and Ueda H. The importance of interaction with membrane lipids through the pleckstrin homology domain of the guanine nucleotide exchange factor for Rho family small GTPase, FLJ00018 *Biol. Pharma. Bull.* **36**: 1204-1207 (2013) (査読有)
6. Sato K., Handa H., Kimura M., Okano Y., Nagaoka H., Nagase T., Sugiyama T., Kitade Y. and Ueda H. Identification of Rho family specific guanine nucleotide exchange factor, FLJ00018 as a novel actin-binding protein. *Cell. Signal.* **25**: 41-49 (2013) (査読有)
7. Sugiyama T., Gotou T., Moriyama K., Nodoka Kajiura K., Hasegawa T., Tomida J., Takahashi K., Komatsu T., Ueda H., Sato K., Tokoro S., Neri P. and Mori H. Mechanism of inhibition of lipopolysaccharide-induced interferon- β production by 2-aminopurine. *Mol. Immun.* **52**:299-304. (2012) (査読有)
8. Yasui Y., Miyazawa D., Hiroshi Ueda H., Sato K., Kitade Y. and Yamada K. PMA-induced GCMa phosphorylation stimulates its transcriptional activity and degradation. *Biomed. Res.* **33**:217-224. (2012) (査読有)
9. Yasui Y., Yamada K., Takahashi S., Sugiura-Ogasawara M., Sato K., Miyazawa D., Sugiyama T., Kitade Y., and Ueda H. PMA induces GCMa phosphorylation and alters its stability via the PKC- and ERK-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**:1127-1132. (2012) (査読有)
10. Nagae R., Sato K., Yasui Y., Banno Y., Nagase T. and Ueda H. G_s and G_q signalings regulate hPEM-2-induced cell responses in Neuro-2a cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **415**:168-204. (2011) (査読有)

[学会発表](計 7件)

1. 佐藤克哉、鈴木敬浩、山口佳洋、北出幸夫、長瀬隆弘、上田浩: PLEKHG2/FLJ00018 の EphB2/Src シグナルによるリン酸化と SH2 ドメイン含有蛋白質との相互作用 第87回日本生化学会大会 2014年10月17日. 京都国際会館(京都府京都市)
2. 佐藤克哉、木村正志、長岡仁、長瀬隆弘、北出幸夫、上田浩: Rho 活性化因子 FLJ00018 と Four and a half LIM domain 1 との相互作用 第86回日本生化学会大会 2013年9月12日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
3. 上田浩、佐藤克哉、武藤吉徳、長瀬隆弘: Rho 特異的活性化因子 PLEKHG2 の G α s/PKA 経路による制御 第86回日本生化学会大会 2013年9月12日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
4. 杉山剛志、高橋圭太、上田浩、佐藤克哉、長瀬隆弘、森裕志: Rho ファミリーグアニンヌクレオチド交換因子 FLJ00018 は To11 様受容体 2 から MyD88 依存的シグナルを増強する 第85回日本生化学会大会. 2012年12月

- 16日. 福岡国際会議場(福岡県福岡市)
5. 佐藤克哉、半田浩章、木村正志、岡野幸雄、長岡仁、長瀬隆弘、杉山剛志、北出幸夫、上田浩: Rho 特異的活性化因子 FLJ00018 とアクチンの相互作用による FLJ00018 の機能制御 第85回日本生化学会大会. 2012年12月16日. 福岡国際会議場(福岡県福岡市)
6. 佐藤克哉、北出幸夫、長瀬隆弘、上田浩: $G\beta\gamma$ -RhoGEF, FLJ00018 の EGFR によるリン酸化とその細胞機能. 第84回日本生化学会大会合同大会. (2011年9月24日). 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
7. 上田浩、佐藤克哉、加藤久司、長瀬隆弘: Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質活性化因子 GiRhoGEF と $G\alpha i2$ の相互作用による活性制御 第84回日本生化学会大会合同大会. (2011年9月24日). 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

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

赤尾 幸博 (AKAO Yukihiro)
岐阜大学・連合創薬医療情報研究科・教授
研究者番号: 00222505