



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PLEKHG2/FLJ00018の新規活性制御機構とその細胞機能

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2015-04-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐藤, 克哉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/49052

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
PLEKHG2/FLJ00018の新規活性制御機構とその細胞機能

Cellular functions of novel regulation mechanisms of FLJ00018, a Rho family small G-protein-specific guanine nucleotide exchange factor

2014

佐藤 克哉

目次

序論	1
第 1 章 FLJ00018 の EGF 受容体刺激を介したリン酸化及び活性化	
第 1 節 緒言	7
第 2 節 実験材料及び実験方法	
1. プラスミドと試薬	9
2. 細胞培養とトランスフェクション	10
3. Serum response element 依存的転写活性 (SRE 活性) 測定	10
4. フオスファターゼによる FLJ00018 の脱リン酸化	10
5. イムノプロット解析	11
6. Mn ²⁺ Phos-tag SDS-PAGE	11
7. 蛍光蛋白質による細胞形態の観察	12
8. 統計と分析	12
第 3 節 結果	
1. FLJ00018 のβ ₁ アドレナリン受容体刺激を介したシグナルによる制御	13
2. FLJ00018 のβ ₁ AR を介する EGF 受容体 transactivation 機構による活性化	14
3. FLJ00018 の EGF 刺激によるリン酸化と活性化	17
4. FLJ00018 の H-Ras を介する活性化	20
5. FLJ00018 は H-Ras/MAPK 経路を介する活性化	21
6. EGF 刺激を介した FLJ00018 リン酸化に関わる構造の同定	23
7. EGF 刺激による FLJ00018 リン酸化に関わるアミノ酸の同定	25
8. EGF 刺激を介した FLJ00018 による神経突起形成と細胞伸展	27
第 4 節 考察	30

第2章 非受容体型チロシンキナーゼ Src を介したチロシンリン酸化

第1節 緒言	34
第2節 実験材料及び実験方法	
1. プラスミドと試薬	36
2. 細胞培養とトランスフェクション	36
3. SH2 ドメインアレイ	36
4. イムノプロット解析	37
5. 免疫沈降	37
第3節 結果	
1. FLJ00018 の cSrcCA によるチロシンリン酸化	39
2. cSrcCA による FLJ00018 のチロシンリン酸化部位の同定	39
3. FLJ00018 の 489 番目のリン酸化チロシン残基と特異的に 相互作用する生体分子の探索	41
4. FLJ00018 と ABL1 および PIK3R3 との相互作用	42
5. Ab11 及び SrcCA による FLJ00018 のチロシンリン酸化とシグナル伝達経路	42
6. EphB2/Src シグナル経路による FLJ00018 のチロシンリン酸化	43
第4節 考察	46

第3章 FLJ00018 と非筋細胞アクチンの相互作用と活性調節

第1節 緒言	48
第2節 実験材料及び実験方法	
1. プラスミドと試薬	50
2. 酵母 two-hybrid スクリーニング	50
3. 細胞培養とトランスフェクション	51
4. Serum response element 依存的転写活性 (SRE 活性) 測定	51
5. 免疫沈降	51
6. Pull-down アッセイ	52

7. 細胞免疫染色と細胞形態の観察	52
第3節 結果	
1. FLJ00018 相互作用分子としての非筋細胞アクチンの同定	53
2. 培養細胞内における FLJ00018 と γ -アクチン及び β -アクチンとの相互作用	54
3. β -アクチンとの相互作用に関わる FLJ00018 上の配列の同定	55
4. β -アクチンおよび γ -アクチンによる FLJ00018 を介した SRE 依存的転写活性の抑制	57
5. β -アクチンが FLJ00018 と G $\beta\gamma$ との相互作用に与える影響	60
6. FLJ00018 とアクチンの細胞内における局在	60
第4節 考察	63

第4章 FLJ00018 と Four and a half LIM ドメイン 1 (FHL1) との 相互作用と活性調節

第1節 緒言	65
第2節 実験材料及び実験方法	
1. プラスミドと試薬	67
2. 細胞培養とトランスフェクション	67
3. Serum response element 依存的転写活性 (SRE 活性) 測定	67
4. 免疫沈降	67
5. 細胞免疫染色と細胞形態の観察	68
第3節 結果	
1. FLJ00018 相互作用分子としての Four and a half LIM domain1 (FHL1) の同定	69
2. 培養細胞内における FLJ00018 と FHL1 との相互作用	69
3. FHL1 との相互作用に関わる FLJ00018 上の配列	71
4. FHL1 との相互作用に関わる FLJ00018 P2 上の配列の同定	71
5. FHL1 が FLJ00018 を介した SRE 依存的転写活性に与える影響	73

6. FHL1 が FLJ00018 と G $\beta\gamma$ の相互作用に与える影響	75
7. FHL1 による FLJ00018 を介した SRE 活性上昇に対するアクチンの影響	76
8. FLJ00018 と FHL1 の細胞内における局在及び細胞形態変化	77
第 4 節 考察	82
総括	85
謝辞	89
参考文献	89
略語一覧表	98
論文目録	101

序論

ヒトのからだは約 60 兆個の細胞から構成されており、それぞれの細胞は、その性質に応じて、上皮組織、結合組織、筋組織、神経組織などの組織を構成する。組織が立体的、三次元的に配置され各種の器官、臓器が形成され、からだがつくられている。我々のからだは、外的環境の変化に適応し、体内の環境を維持する恒常性を保つような機能を有している。恒常性を維持するためには、外界の変化に対し、神経伝達物質、ホルモン、サイトカインなどの様々な生体内物質の量的变化が起こり、神経系、内分泌系、免疫系などの各種システムがそれに対応し、種々の生体反応を引き起こす。このような恒常性の維持が崩れると身体は正常に機能を保つことができず、疾患を発症する原因となる。

細胞レベルでは、細胞膜上及び細胞内に細胞外シグナルを受け取る役目を果たす各種受容体が存在する。受容体が細胞外シグナルを細胞内シグナルへと変換し、正しい経路を経てシグナルを伝えることで細胞増殖、細胞分化、細胞遊走、細胞形態変化などの細胞応答が引き起こされる。細胞におけるシグナル伝達に関わる分子の機能に異常が起きると恒常性の維持が崩れ、細胞は正常に機能を保つことができなくなる。そして、細胞死や異常な細胞増殖を引き起こし、それらが個体レベルでの疾患を発症する原因となると考えられる。

シグナル伝達の異常によって引き起こされる疾患の中でも、がんは、現在の日本人の死因に占める割合が最も高く、その克服は特に国家的重要課題のひとつである。がんは様々な要因により遺伝子変異が蓄積することで、引き起こされる。変異の種類は 2 つに大別され、1 つは、細胞増殖のシグナル伝達に関わる原がん遺伝子の *gain of function* 変異によって、恒常的活性化型になることによるものである。もう一つは、正常細胞では、細胞の異常な増殖を抑制するがん抑制遺伝子の *loss of function* 変異によるものである。蛋白質構造の細胞内ドメインにおいてチロシンキナーゼドメインを有する受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の多くは、膜一回貫通型の受容体であり様々な組織の増殖に関わっている。上皮増殖因子受容体 (EGFR) も、RTK の一種であり、この受容体の変異によるシグナル伝達の異常はがんの一つの原因となり得る。特に、非小胞性肺癌病変において EGFR に複数の変異が生じており、その中には、チロシンキナーゼが恒常的に活性化した *gain of function* 型の変異も含まれる (1-3)。

生体膜上に存在する別の大きな受容体ファミリーである三量体グアニンヌクレオチド結合蛋白質共役型受容体 (GPCR) は、ヒトゲノムの約 2%を占め、800 種類以上存在していると考えられており、シグナル伝達に関する研究において、細胞膜上の標的分子としては一番大きなファミリーである。GPCR 上の変異も様々ながんの発達との関連が指摘されている (4)。GPCR は、細胞内において、グアニンヌクレオチド結合蛋白質 (G 蛋白質) の一種である三量体 G 蛋白質と共役しており、受容体刺激により、 $G\alpha$ サブユニットと $G\beta\gamma$ サブユニットに解離し、それぞれが下流のエフェクターに作用することでシグナルを伝える (5)。 $G\alpha$ サブユニットには、 G_s , G_i , $G_{q/11}$, $G_{12/13}$ の 4 つのサブファミリーが存在し、全部で 20 種程の遺伝子産物が存在する。 $G\beta$, $G\gamma$ はそれぞれ、5 種及び 14 種の遺伝子産物が存在し、それぞれが異なるエフェクターに作用している (Fig. 1)。 $G\alpha$ サブユニットは不活性化状態では GDP と、活性化状態では GTP と結合しており、GPCR 刺激による GPCR の構造変化に伴い、GDP から GTP への変換が行われる。

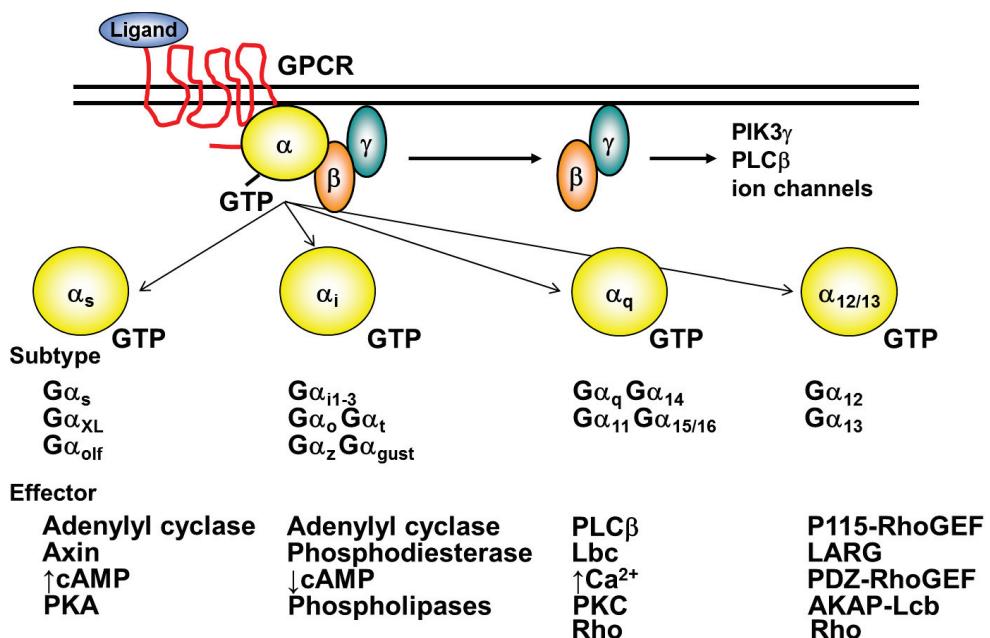


Fig. 1 三量体 G 蛋白質の種類とエフェクター蛋白質の活性化

各種受容体における変異とがん発症との関わりも含め、上述したように、細胞内シグナル分子の異常を伴う正常なシグナル伝達の破綻によるがんの発症において、遺伝子変異が多段階に蓄積すると考えられている。大腸癌の場合、初めに、遺伝的要因や、外的環境に由来するイニシエー

ターが、がん抑制遺伝子の APC の欠損を引き起こす。続いて、細胞増殖に関わる原がん遺伝子である K-Ras 上に活性化型変異が生じる。実際、大腸の正常上皮が異常増殖した初期の腺腫において、ある一定の確率で APC 変異が生じていることが示唆されており、腺腫の大きさと K-Ras の変異における相関関係が指摘されている。更にこの後、がん抑制遺伝子である p53 の変異により、浸潤性癌が発達すると考えられている (Fig. 2) (6)。

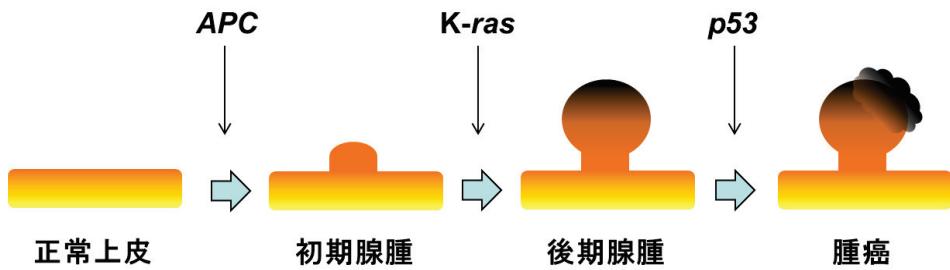


Fig. 2 大腸癌における多段階発癌

K-Ras は Ras スーパーファミリーに属する低分子量 GTP 結合蛋白質 (small GTPase) の一種である。small GTPase は単量体で働き、結合する GTP と GDP の結合状態によって活性化状態が変化し、不活性化状態では GDP と、活性化状態では GTP と結合しており、GDP/GTP 交換反応はグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF)、GTPase 活性化蛋白質 (GAP)、グアニンヌクレオチド解離抑制因子 (GDI) などによって制御される。GEF は GDP から GTP への変換を、GAP は Small GTPase 自身の GTP を GDP へ分解する GTPase 活性を活性化させ、GDI は GDP 結合型の GTPase を安定化させる役割を果たしている (Fig. 3)。Ras スーパーファミリーに属する small GTPase は、遺伝子構造から、Ras, Rho, Rab, Ran, Arf の 5 つのサブファミリーに分類され、細胞機能もそれぞれの構造から大別できる。それぞれ細胞機能については、Ras は細胞増殖、Rho はアクチン細胞骨格再構築を介して細胞形態や運動性の制御を担い、Rab は核内輸送、そして Ran 及び Arf は、細胞内小胞輸送に関与する (Fig. 4)。

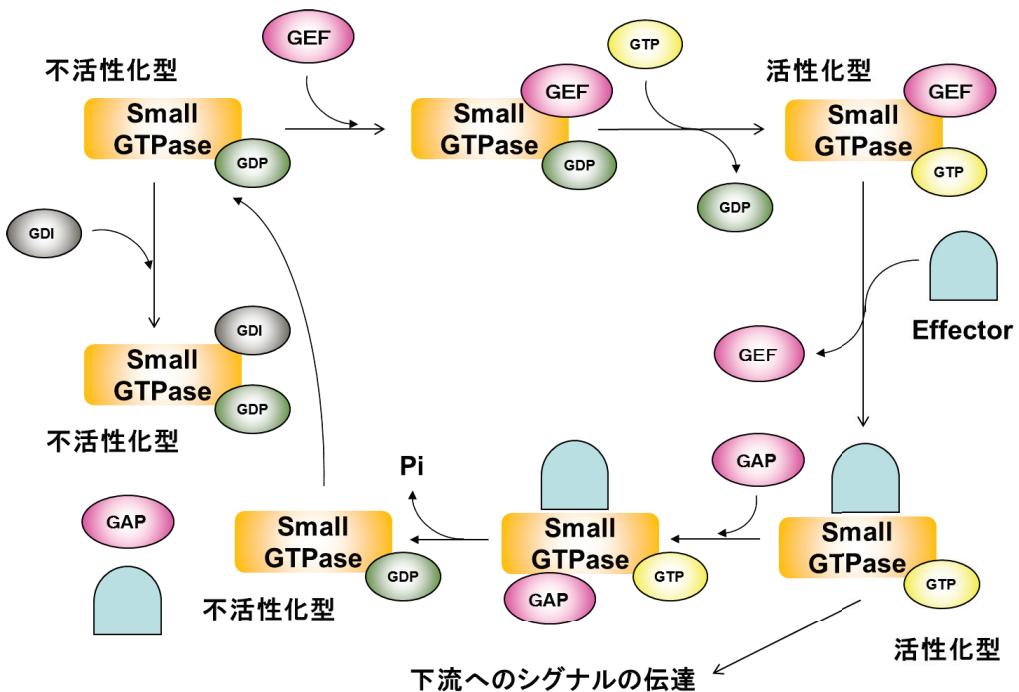


Fig. 3 Small GTPase シグナル分子のシグナルスイッチ

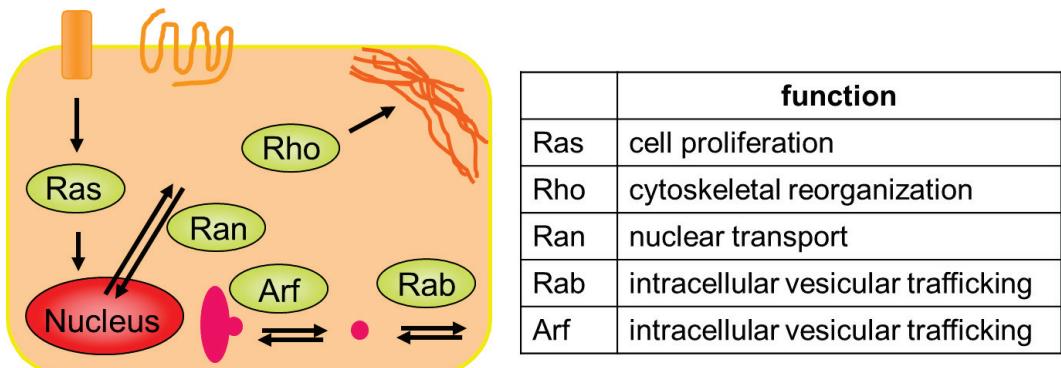


Fig. 4 Small GTPase の種類と機能

近年、GPCR シグナルによる Small GTPase シグナルの制御機構が明らかになりつつある (Fig. 5)。特に、細胞形態や運動性の制御に重要なアクチン細胞骨格の再編成を担う Rho ファミリー-Small GTPase (RhoGTPase) の変異は癌の浸潤、転移能の獲得に重要であると考えられており、GPCR による RhoGTPase の活性制御機構を理解することはがんの病態解明に重要であると考えられており、最近、がん病変において、Rac の変異が発見されている (7)。RhoGTPase は、ヒトでは 23 種が知られており、RhoA, Rac1, Cdc42 は特に研究が進んでいる分子である (8)。RhoA が活性化するとアクチントレスフィバーが形成され、細胞の収縮、接着に寄与してい

る。また、Rac1 の活性化は、葉状仮足 (lamellipodia) を、Cdc42 の活性化では糸状仮足 (filopodia) の形成がそれぞれ促進され、細胞質を広げ、細胞の伸展や、神経突起の伸長などに関与すると考えられている (9) (Fig. 6)。RhoGTPase の GDP 結合から GTP 結合への変化に伴う活性化は、RhoGTPase に特異的な GEF (RhoGEF) によって制御される (10)。RhoGEF は 2 つのファミリーに分類され、1 つは GEF の触媒活性を有する Dbl homology domain (DH ドメイン) と細胞膜への移行に関わる Pleckstrin homology domain (PH ドメイン) を有する Dbl ファミリーである。現在までに、ヒトにおいて Dbl ファミリーの RhoGEF は約 70 種同定されている (11,12)。RhoGEF のもう 1 つのファミリーは、DH や PH ドメインを有さない代わりに Dock homology region (DHR) 2 ドメインを持つ CDM-zizimin homology (CZH) 蛋白質ファミリーであり、ヒトでは 11 種が知られている (13)。これらの内、Dbl ファミリーの RhoGEF の一種である、leukemia-associated RhoGEF (LARG), P115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF は、DH ドメイン、PH ドメインに加え、Regulator of G-protein signaling domain (RGS ドメイン) を有しており、この RGS ドメインを介して三量体 G 蛋白質の $\text{G}\alpha_{12/13}$ と結合することで活性化され、RhoA の GDP/GTP 交換反応を仲介する (14-16)。また、p63-RhoGEF や、Trio, Karilin といった RhoGEF は三量体 G 蛋白質の $\text{G}\beta\gamma$ サブユニットによって活性化されることが報告されている (17-19)。一方、三量体 G 蛋白質の $\text{G}\beta\gamma$ サブユニットによって活性化される RhoGEF に P-Rex1 が知られている (20)。活性化された P-Rex1 は Rac の活性化を介し、細胞形態変化に関わっていると考えられており、近年、乳がん患者のがん病変において、P-Rex1 の過剰発現が見られることことが報告されている (21)。

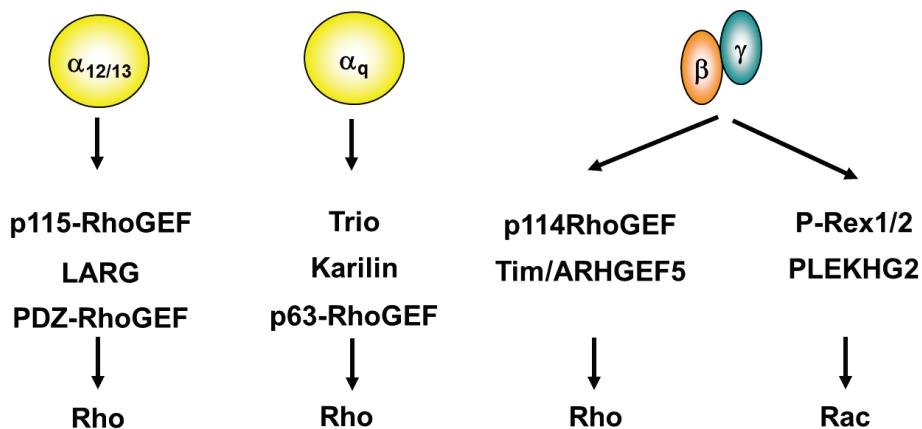


Fig. 5 三量体 G 蛋白質シグナルによる RhoGEF 及び Rho の活性化

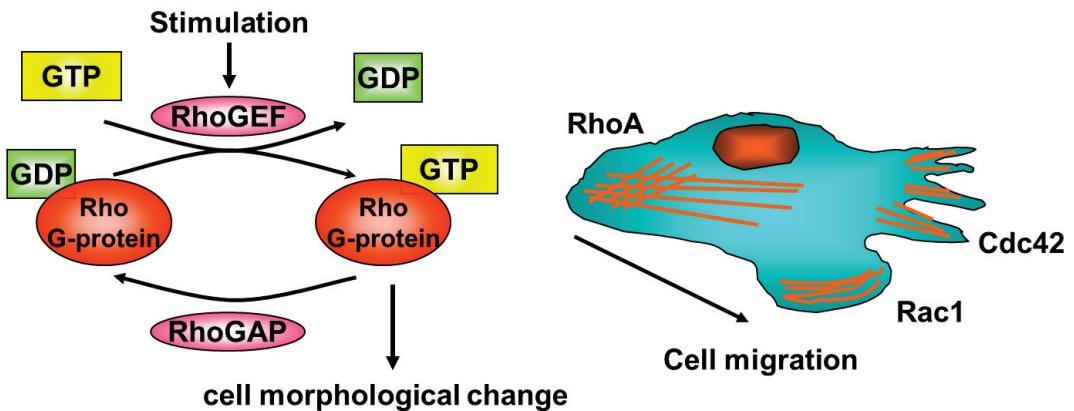


Fig. 6 RhoGTPase の種類と機能

PLEKHG2/FLJ00018 は、マウスのリンパ腫や骨髓性白血病モデルにおいて、レトロウイルスの取り込みサイトである Evi24 へのプロウイルス取り込みによって、発現上昇される Dbl ファミリーの RhoGEF の一種として同定された (22)。また、他の Dbl ファミリーの RhoGEF と同様に、FLJ00018 も N 末端付近の配列に DH ドメインと PH ドメインを持ち、Ueda らにより、FLJ00018 の DH ドメインを含む N 末端付近の配列が GPCR 刺激により遊離した三量体 G 蛋白質の $G\beta\gamma$ サブユニットと直接結合することによって活性化されることが報告されている (23)。活性化された FLJ00018 は、RhoGTPase の Rac1, Cdc42 を活性化し、細胞形態の変化を引き起こす。近年、免疫系の培養細胞の一種である jurkat T 細胞においても、FLJ00018 が $G\beta\gamma$ によって活性化され、細胞遊走に関与しうることが報告された (24)。一般的に、RhoGEF 分子は高分子量を持つ巨大な蛋白質であり、複雑な活性制御を受けることが考えられる。FLJ00018 も、1386 ものアミノ酸を持ち、複雑な制御機構が存在することが考えられる。しかしながら、現在のところ、FLJ00018 の DH ドメイン、PH ドメイン以外の配列に目立った機能ドメインはなく、DH, PH ドメイン以外の残りの C 末端側の構造が細胞機能に与える役割は未知である。そこで本研究では、癌の浸潤・転移機構の病態の一端を解明するべく、FLJ00018 の新規活性制御機構の探索と、その活性制御が細胞機能に与える影響の検討を行った。

第1章 FLJ00018 の EGF 受容体刺激を介したリン酸化及び活性化

第1節 緒言

いくつかの RhoGEF は、複数の GPCR シグナルによる制御を受けることが報告されている。構造中に RGS ドメインを含む RhoGEF である、p115-RhoGEF や LARG, PDZ-RhoGEF は、 $\text{G}\alpha_{12/13}$ と、その RGS ドメインを介して活性化され、RhoA に対する GEF 活性を示す (14)。一方で、PDZ-RhoGEF は、その N 末端の構造中の PSD-95/Dlg/Zo-1 domain (PDZ ドメイン) を介し、LPA 受容体と結合し、RhoA を活性化する (25)。また、PDZ-RhoGEF を含むこれらの RhoGEF 群は別の三量体 G 蛋白質αサブユニットである、 $\text{G}\alpha_q$ とも、PDZ ドメインを介して相互作用し、RhoA を活性化することが報告されている (26)。

蛋白質のリン酸化は、細胞内シグナル伝達を担う蛋白質を活性化する重要な手段の一つである。近年、増殖因子受容体刺激や神経成長因子受容体刺激によって活性化される RhoGEF の存在も広く知られており、約 70 種の RhoGEF のうち、少なくとも 19 種は増殖因子受容体によって活性化を受けることが知られている (27)。この中には、 βPIX や Vav3, Asef といった RhoGEF も含まれる。Asef は、EGFR によってチロシンリン酸化されることにより活性化され、Rac1, Cdc42 の活性化を引き起こす (28)。また、 βPIX は、線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) の下流においてセリン/スレオニンリン酸化を受けて活性化されることが知られている (29)。

さらに近年、リン酸化以外の蛋白質翻訳後修飾による蛋白質の局在変化、及び活性制御の機構も明らかにされつつある。例えば、p63-RhoGEF は、その蛋白質の 23, 25 及び 26 番目のシステイン残基がパルミトイル化され、これにより細胞膜への局在が可能となり RhoA 活性を示すことが報告されている (30)。

このように、いくつかの RhoGEF は複数の GPCR シグナルによって活性化され、RhoGTPase を活性化する。また、RhoGEF は GPCR を活性化する一方で、GPCR 以外のシグナルによってリン酸化やパルミトイル化を含む翻訳後修飾を介し、活性化されることが知られつつあり、これは一つの RhoGEF が複数のシグナル伝達経路に関与しうることを示唆している。しかしながら、FLJ00018 の $\text{G}\beta\gamma$ 以外のシグナルによる活性化機構の有無は未だ明らかにされていない。このよ

うな背景から、本章では、FLJ00018 の新規の活性化機構の有無、FLJ00018 の翻訳後修飾による活性化の有無について検討を行い、その活性化機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

第2節 実験材料および方法

1. プラスミドと試薬

pcDNA3.1- β_1 -アドレナリニン受容体 (β_1 AR), pcDNA3.1-G β_1 , pcDNA3.1-G γ_2 , pcDNA3.1-H-Ras AC (H-Ras 恒常的活性化型変異体), pcDNA3.1-H-Ras T17N (H-Ras ドミナントネガティブ変異体), pcDNA3.1-RhoA T19N, pcDNA3.1-Rac1 T17N, pcDNA3.1-Cdc42 T17N, pCMV5 は、Missouri S&T cDNA Resource Center から購入した。これらのプラスミドは、PCR 法を用いて pF4A-CMV ベクター、pF5A-CMV-neo ベクター及び、pFN21A ベクターに組み換えられた。pCMV5- β ARKct は、奈良先端大学院大学 伊東広先生から供与された。pFC21A-Halo-EGFR, pFN21K-Halo-Vav3 は、かずさ DNA 研究所より供与された。FLJ00018 遺伝子の完全長 cDNA クローンは、かずさ DNA ヒト長鎖遺伝子解読プロジェクトにより得られた (31)。野生型 FLJ00018 の発現クローンを得る為に FLJ00018 の ORF 領域は Gateway システム (Life Technologies) を用いて pcDNA3.1-DEST47 ベクターに組み換えられた。pcDNA3.1-DEST47-FLJ00018 は、制限酵素処理、PCR 法を用いて pFN21A-Myc ベクターもしくは pFN21K-Halo ベクターに組み換えられた。各図に示した FLJ00018 の各種欠損変異体は、pFN21A-Myc-FLJ00018 を用いて制限酵素処理、PCR 法を用いて作製された。FLJ00018 の各種欠損変異体および、FLJ00018 T680A は pFN21A-Myc-FLJ00018 を鋳型にし、PCR 法 (Stratagene) を用いて作製した。アザミグリーン (AG ; Azami green) は、イシサンゴより単離された新規蛍光蛋白質である (32)。この蛍光蛋白質をアミノ酸置換により単量体で存在できるようにした蛋白質プラスミド、phmAG1-MCLinker は MBL より購入した。この遺伝子を用い、PCR 法、制限酵素処理により pFN21A-mAG-FLJ00018 を作製した。pSRE.L-luciferase reporter は、Stratagene から、pRL-SV40 は、Nippon Gene から購入した。Isoproterenol および KN-93 及び、SB202190 は、Calbiochem, EGF は、Peprotech から購入した。AG1478, U0126 は、Wako から購入した。SP600125 は、Sigma から購入した。phosphatase inhibitor および protease inhibitor は、Roche から購入した。Lambda phosphatase とアルカリフェオヌフアター ゼは、New England Biolabs から購入した。

2. 細胞培養とトランスフェクション

NIH3T3 細胞は、37°C, 5% CO₂ 加湿大気圧下で、10% calf serum (CS) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で培養した。HEK293 細胞と Neuro-2a 細胞は 37°C, 5% CO₂ 加湿大気圧下で、10% Fetal Bovine Serum (FBS) を添加した DMEM で培養した。一過性のトランسفェクションは Lipofectamine-Plus 試薬を用いて製品の使用法に従って行った (Life Technologies)。serum response element (SRE) 依存的遺伝子転写活性測定には 0.4 μg の DNA を、イムノプロット解析には 1 μg の DNA を、免疫沈降法には 2 μg の DNA を用いた。トランسفェクションの 3 時間後、細胞に 1× insulin-transferrin-selenium-X (Invitrogen) を加え、6-8 時間培養した。その後、細胞を無血清培地に置き換え、16-18 時間培養した。

3. Serum response element 依存的転写活性 (SRE 活性) 測定

24 穴プレートに播種した細胞に各種発現プラスミドとともに pRL-SV40 コントロールレポータープラスミド、pSRE.L-luciferase プラスミドをトранسفェクションした。各図に示した時間と濃度で各種阻害剤処理を行った後、細胞を刺激した。その後、細胞を氷冷 PBS で 1 回洗浄後、細胞溶解液を用いて細胞を溶解した。細胞溶解液を 13200 rpm, 10 min で遠心後、上清を分離した。ルシフェラーゼ活性測定は dual luciferase reporter assay system (Promega) を用いて、製品の使用方法に従って行った。レポーター活性はコントロールベクターの活性に対して標準化し、データは実験の平均値±S.D. を示した。

4. フォスファターゼによる FLJ00018 の脱リン酸化

トランسفェクションした細胞を各図に示した濃度と時間により刺激した。その後、細胞を氷冷 PBS で一回洗浄し、細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, protease inhibitor) 中で溶解し、溶解液を 13200 rpm, 10 min 遠心した。遠心後、等量の上清に 10 unit のアルカリフォスファターゼまたは、400 unit の Lambda phosphatase を加え、30°C、2 時間反応させた。反応は 2× SDS sample buffer を加えることで停止させ、サンプルのリン酸化状態はイムノプロットによって解析した。

5. イムノプロット解析

トランスフェクションを行った細胞を各図に示した濃度と時間により各種阻害剤処理後、細胞を刺激した。細胞を氷冷 PBS で一回洗浄し、1% (w/v) SDS / 20 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA 溶液 (pH 8.0) で溶解した。細胞破碎液を凍結乾燥させ、1×SDS sample buffer に溶解させた。細胞破碎液中の総蛋白量は BCA protein assay kit (Thermo Scientific) を用いて測定した。発現プラスミドの蛋白質発現を確認する為、等量の蛋白質を 7.5% もしくは 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した。プロット後、PVDF メンブレンを 3%スキムミルクもしくは 5% Bovine serum albumin (BSA) を添加した TBS-T (Tris buffered saline ; 20 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.15 M NaCl, 0.01% NP-40) 中でブロックした。Myc-タグを付加した FLJ00018 は一次抗体に 1:2000 希釈した Anti-Myc モノクロナール抗体 (Roche, 0.2 µg/ml) を用い、二次抗体に 1:5000 希釈した horseradish peroxidase (HRP)-標識モノクロナール抗マウス IgG 抗体 (MBL) を用いて検出した。Halo-タグを付加した FLJ00018 もしくは Vav3 は一次抗体に 1:2000 希釈した Anti-Halo ポリクロナール抗体 (Promega, 0.2 µg/ml) を用い、二次抗体に 1:5000 希釈した HRP-標識ポリクロナール抗ウサギ IgG 抗体 (MBL) を用いて検出した。EGFR は一次抗体に 1:2000 希釈した Anti-EGFR モノクロナール抗体 (Santa Cruz, 1000 µg/ml) を用い、二次抗体に 1:5000 希釈した HRP-標識モノクロナール抗マウス IgG を用いて検出した。リン酸化チロシン蛋白質の検出には、一次抗体に 1:2000 希釈した Anti-P-Tyr (PY20) モノクロナール抗体 (Santa Cruz Biotechnology, stock 100 µg/ml) を用い、二次抗体に 1:5000 希釈した HRP-標識モノクロナール抗マウス IgG 抗体を用いた。各種蛋白質の可視化は、enzyme-linked chemiluminescence 試薬 (GE Healthcare) を用いて LAS-4000 image analyzer (Fuji Film) で検出した。

6. Mn²⁺ Phos-tag SDS-PAGE

リン酸化された FLJ00018 の有無を確かめる為、新規に開発されたイムノプロット技術を用いた。これは Mn²⁺と錯体を形成させた Phos-tag AAL107 分子を SDS ポリアクリルアミドゲル

中に混合させ、電気泳動を行う方法である（33）。電気泳動中にリン酸化蛋白質は AAL107 分子と相互作用し、通常の蛋白質の電気泳動と比べ移動度が遅くなるので、リン酸化蛋白質を視覚的に検出することができる。トランスフェクションを行った細胞に各図に示した濃度と時間により各種阻害剤処理、細胞刺激を行った。細胞を氷冷 PBS で一回洗浄し、1% (w/v) SDS H₂O 溶液で溶解した。細胞溶解液を凍結乾燥させ、1× SDS sample buffer に溶解させた。細胞破碎液中の総蛋白量は BCA protein assay kit (Thermo Scientific) を用いて測定した。野生型 FLJ00018 (FLJ00018 WT) リン酸化の検出には、アガロースを加えた低濃度のアクリルアミドゲルを用いた（34,35）。13 μM Phos-tag AAL107 (Wako), 26 μM MnCl₂, 1.5% アガロースを加えた 3% SDS-PAGE で分離した。FLJ00018 の各種変異体のリン酸化検出には、15 μM Phos-tag AAL107 (Wako), 25 μM MnCl₂, 6% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた。電気泳動後、1 mM EDTA 溶液でゲルを 10 分間洗浄し、Mn²⁺を除いた後でイムノプロットを行った。

7. 蛍光蛋白質による細胞形態の観察

カバーガラス上で一過性に強制発現させた細胞を氷冷 PBS で一回洗浄後、30 分間、4% パラホルムアルデヒド固定させた。その後カバーガラスを Perma Fluor で処理させ、蛍光イメージを蛍光顕微鏡により観察した (BZ-9000; KEYENCE)。各 sample から、無作為に選択した合計 10 枚の蛍光画像を取得し、合計 50 細胞の細胞について統計解析を行った。細胞の計測は Image J ソフトウェアを用いて行った。

8. 統計と分析

データは少なくとも 3 回の実験から平均値±S.D.の値を示した。グループ間の違いの統計は student-T-test に従い、解析を行った。有意差の P 値は<0.05とした。

第3節 結果

1. FLJ00018 の β_1 アドレナリン受容体刺激を介したシグナルによる制御

過去、FLJ00018 は、m2 ムスカリン性アセチルコリン受容体刺激及び、G $\beta\gamma$ サブユニットによって活性化されることが報告されている (23)。FLJ00018 が、他の GPCR 刺激によって活性化されるかを調べる為、 β_1 AR と FLJ00018 を NIH3T3 細胞内に一過性に共発現させ、Rho GTPase の活性化の指標となる SRE 活性 (36) を測定した。一般的に β_1 AR は G α_s 共役型受容体と考えられており、G α_s シグナルは下流のエフェクターにアデニル酸シクラーゼを有し、 β_1 AR シグナルにおいて、G $\beta\gamma$ の寄与は少ないと考えられている。

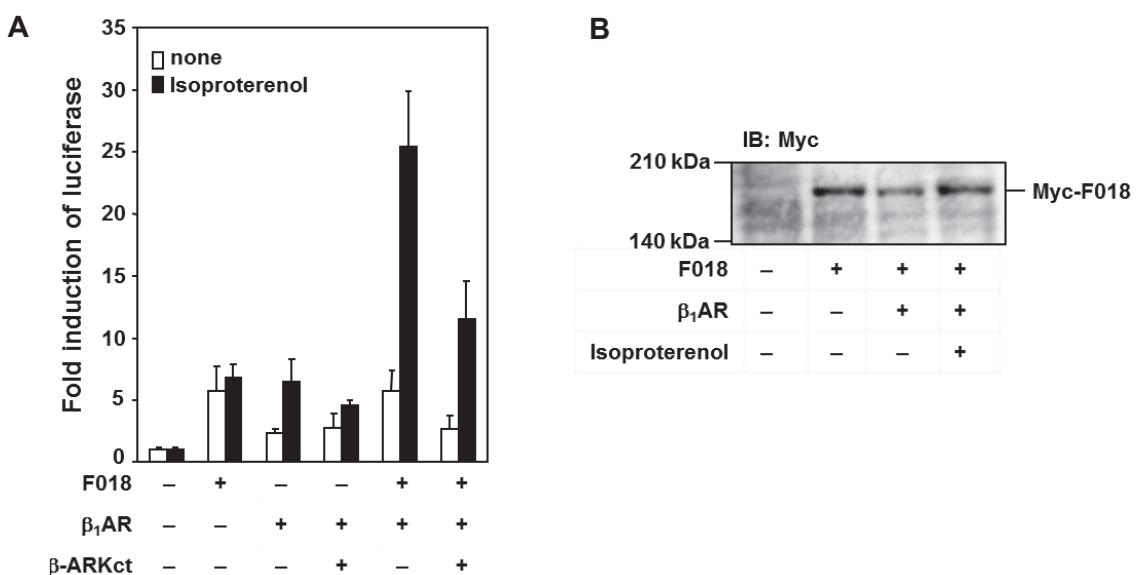


Fig. 1-1 NIH3T3 細胞における FLJ00018 を介した SRE 依存的遺伝子転写活性への Isoproterenol と β -ARKct の影響

A, NIH3T3 細胞に pSRE.L-luciferase, pRL-SV40 プラスマド DNA, FLJ00018, β -ARKct, β_1 AR の発現ベクターをそれぞれ示したようにトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞には、終濃度 20 μ M, 5.5 時間の Isoproterenol 刺激を行った。ルシフェラーゼ活性は dual-luciferase reporter assay system によって測定し、得られた活性は Mock を 1.0 として標準化した値を示した。実験は少なくとも 3 回を行い、値を平均値 \pm S.D. で示した。

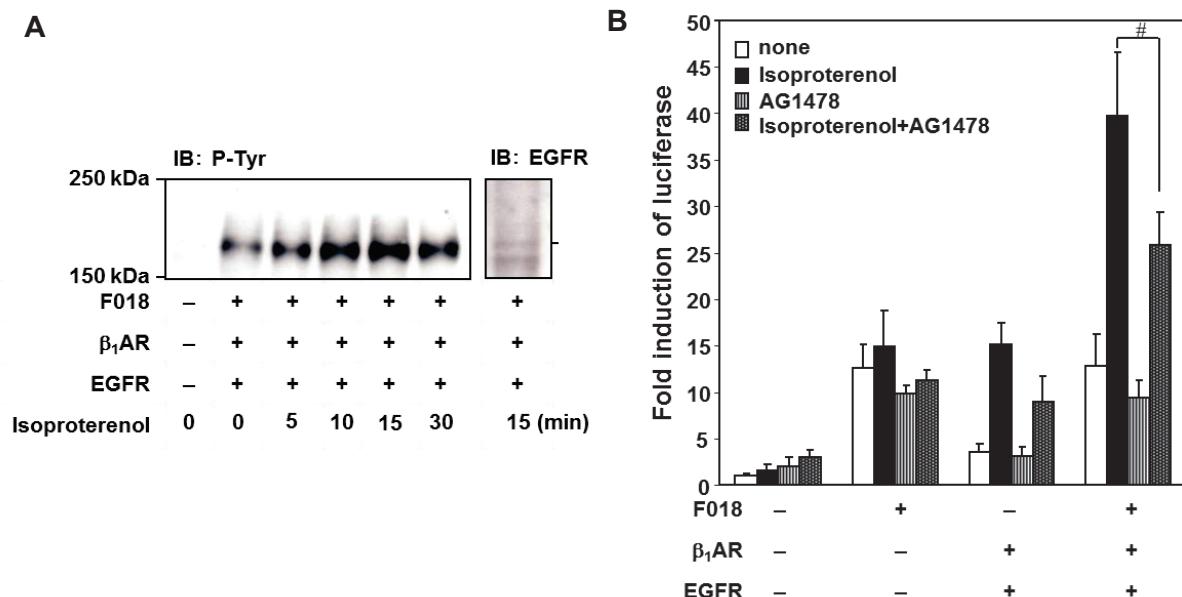
B, NIH3T3 細胞に β_1 AR そして Myc タグを付加した FLJ00018 の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞に Isoproterenol (20 μ M) で 15 分間刺激を行った。等量の蛋白質を 7.5% SDS-PAGE で分離した。イムノプロットは、Anti-Myc 抗体を用いて行った。

FLJ00018 と β_1 AR を共発現させた細胞に、 β AR アゴニストである Isoproterenol (20 μ M) で刺激すると、蛋白質発現に変化は見られないにもかかわらず (Fig. 1-1B) 無刺激の細胞に比べ、

SRE 活性の有意な上昇が見られた (Fig. 1-1A)。この活性上昇は C-terminal of β -adrenergic receptor kinase (β -ARKct) を加えることにより抑制された。 β -ARKct は、刺激により遊離された三量体 G 蛋白質 $G\beta\gamma$ と相互作用することにより、 $G\beta\gamma$ の機能を抑制すると考えられている。しかし、 β -ARKct は、Isoproterenol 刺激に伴う SRE 活性上昇を完全には抑制しなかった。 β -ARKct により抑制されなかった SRE 活性上昇は、 $G\beta\gamma$ 以外の機構が関与していると考えられる。この結果から、 β_1 AR シグナルは $G\beta\gamma$ 非依存的な機構による FLJ00018 の活性化に関与することが示唆された。

2. FLJ00018 の β_1 AR を介する EGF 受容体 transactivation 機構による活性化

一方、近年、GPCR シグナルによって EGFR が活性化されるという transactivation 機構が知られており (37-42)、transactivation を引き起こす GPCR として、 β_1 AR や β_2 AR が知られている。GPCR シグナルにより、EGFR が活性化されるのであれば、EGFR の自己リン酸化機構により EGFR のチロシン残基がリン酸化されると考えられる。このシグナル伝達経路について検討する為、NIH3T3 細胞に EGFR と β_1 AR および FLJ00018 を共発現させ、Isoproterenol 刺激 (20 μ M) 後に、細胞破碎液を用いてイムノブロット解析を行った。



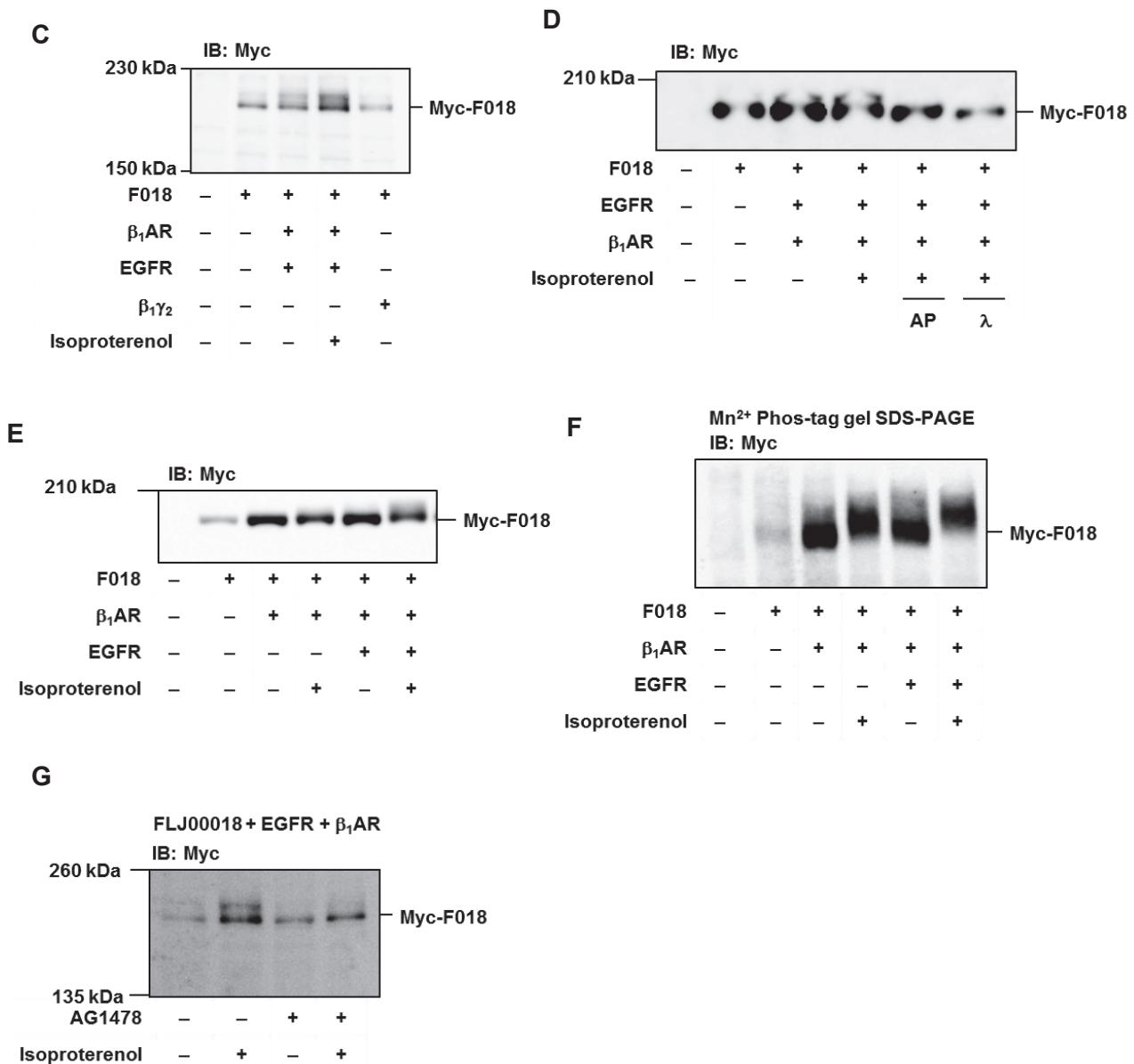


Fig. 1-2 FLJ00018 は、 β_1 AR 刺激を介した EGF 受容体 transactivation により、リン酸化と活性化を受ける。

A, NIH3T3 細胞に EGFR, β_1 AR そして Myc タグを付加した FLJ00018 の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞に Isoproterenol (20 μ M) で 0-30 分間刺激を行った。等量の蛋白質を 7.5% SDS-PAGE で分離した。イムノプロットはそれぞれ、Anti-P-Tyr (PY20) 抗体もしくは Anti-EGFR 抗体を用いて行った。

B, NIH3T3 細胞に pSRE.L-luciferase, pRL-SV40 プラスミド DNA, FLJ00018, β_1 AR, EGFR の発現ベクターをそれぞれ示したようにトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞に、EGFR キナーゼ阻害剤の AG1478 (10 μ M, 1 時間) を前処理後、終濃度 20 μ M, 5.5 時間の Isoproterenol 刺激を行った。ルシフェラーゼ活性は dual-luciferase reporter assay system によって測定し、得られた活性は Mock を 1.0 として標準化した値を示した。実験は少なくとも 3 回行い、値を平均値 \pm S.D. で示した。#, p<0.05。

C, E, G, NIH3T3 細胞 (C, G) 及び HEK293 細胞 (E) に EGFR, β_1 AR, G $\beta_1\gamma_2$ そして Myc タグを付加した FLJ00018 の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞に 10 μ M, 30 分間の AG1478 前処理を行った (G)。その後 Isoproterenol (20 μ M) を用いて 15 分間の刺激を行った (C, E, G)。等量の蛋白質を 7.5% SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 を検出する為にイムノプロットは Anti-Myc を用いて行った。

Fig. 1-2 続き

D, NIH3T3 細胞に EGFR, β_1 AR そして Myc タグを付加した FLJ00018 の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞に Isoproterenol (20 μ M) を用いて 15 分間の刺激を行った。細胞の溶解後、溶解液に、アルカリフオスファターゼ (10 unit) もしくは、Lambda フォスファターゼ (400 unit) を加え、30°C、2 時間反応させた。反応は、SDS サンプルバッファーを加えることで停止させ、それぞれの蛋白質のリン酸化状態をイムノプロットによって確認した。

F, HEK293 細胞に EGFR, β_1 AR そして Myc タグを付加した FLJ00018 の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞に Isoproterenol (20 μ M) を用いて 15 分間の刺激を行った。等量の蛋白質を 13 μ M Phos-tagAAL107, 26 μ M MnCl₂, 1.5%アガロースを加えた 3% SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 を検出する為にイムノプロットは Anti-Myc 抗体を用いて行った。

Isoproterenol 刺激により、EGFR のチロシンリン酸化は、時間依存的に増加し、15 分でピークを示した。この結果から、 β_1 AR 刺激により EGFR の transactivation 機構が引き起こされることが示唆された (Fig. 1-2A)。そこで、Isoproterenol 刺激による FLJ00018 の活性化において、EGFR シグナルの関与があるかを調べる為に、EGFR キナーゼ活性の特異的阻害剤である AG1478 を用い、SRE 活性への影響を検討した。FLJ00018 と β_1 AR および EGFR を NIH3T3 細胞に共発現させ Isoproterenol (20 μ M) 刺激を行うと、SRE 活性の上昇が見られた。しかしながら、AG1478 (10 μ M) 前処理を行った細胞では、Isoproterenol (10 μ M) 刺激に伴う SRE 活性上昇の抑制が見られた (Fig. 1-2B)。同様の条件の細胞における FLJ00018 蛋白質発現量を調べた結果、Isoproterenol 刺激した細胞において、FLJ00018 の電気泳動上の移動度の高分子量側へのシフトが見られた (Fig. 1-2C)。この移動度シフトは G $\beta\gamma$ と FLJ00018 を共発現した細胞では見られなかった。これらの結果から、EGFR transactivation 経路によって FLJ00018 が何らかの修飾を受けて活性化されることが示唆された。近年、Vav や Asef, Tiam-1, β -Pix などの RhoGEF が細胞外刺激によりリン酸化されることが報告されており、RhoGEF のリン酸化が RhoGEF の機能において重要であると考えられる (27,28,43)。FLJ00018 が、EGFR transactivation によってリン酸化を受けるかについて検討する為に、セリン、スレオニン残基のリン酸基を脱離させるアルカリフオスファターゼ及び Lambda フォスファターゼを Isoproterenol 刺激した細胞の溶解液に処理し、反応液をイムノプロット解析することで、試料

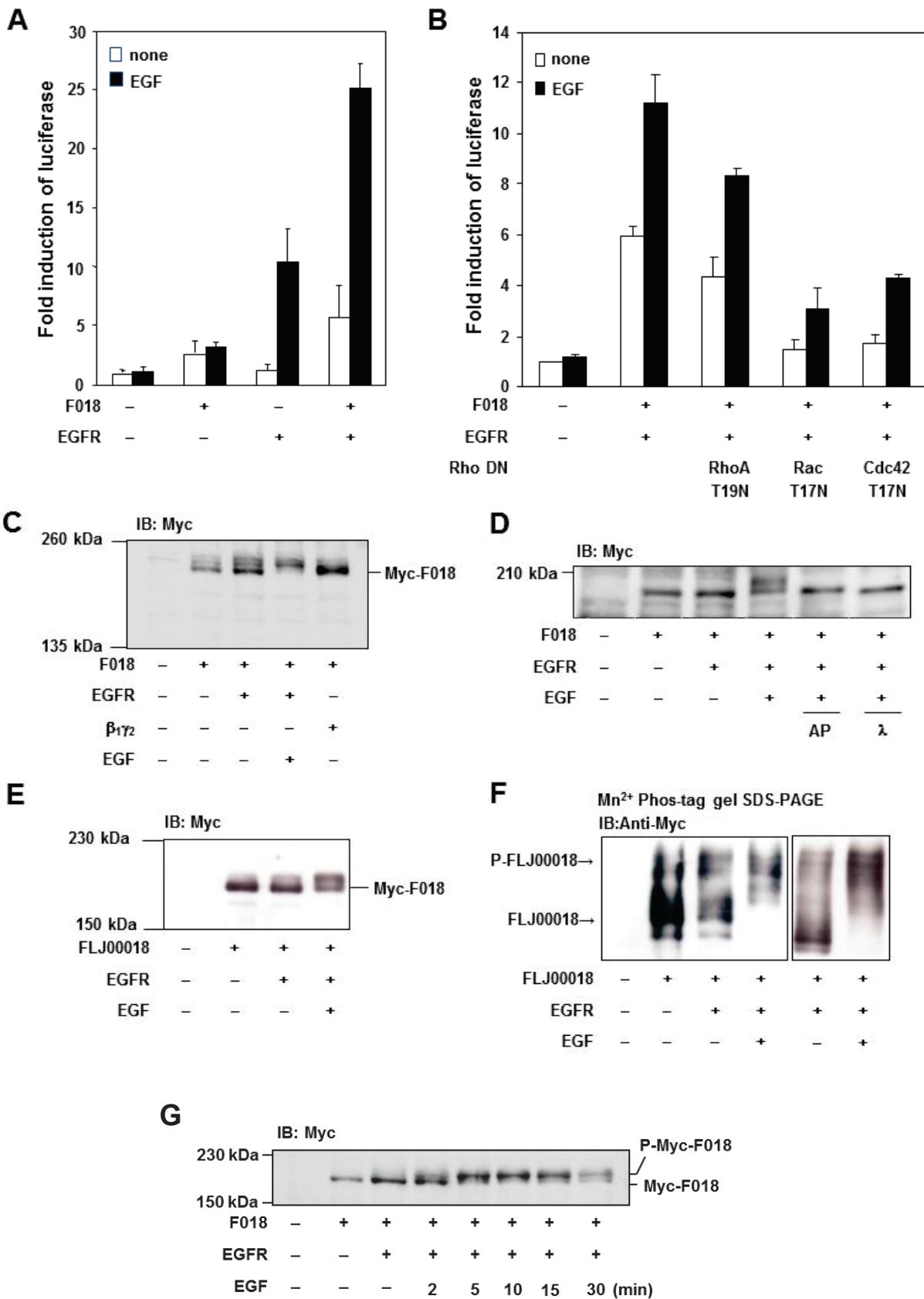
中のリン酸化状態の確認を行った。その結果、どちらのフォスファターゼ処理においても、Isoproterenol 刺激による高分子量側への移動度シフトが見られなくなった (Fig. 1-2D)。また、Phos-tag ゲルを用いたイムノプロット解析を行い、サンプル中の蛋白質のリン酸化の有無の確認も行った。Phos-tag ゲルには、Mn²⁺と錯体を形成させた Phos-tag AAL107 分子が含まれている。電気泳動中にリン酸化蛋白質は AAL107 分子と相互作用し、通常の蛋白質の電気泳動と比べ移動度が遅くなるので、リン酸化蛋白質を視覚的に検出することができる (33-35)。Isoproterenol 刺激した HEK293 細胞の溶解液を調製し、Phos-tag ゲルにおいて解析を行ったところ、通常の電気泳動時に見られた Isoproterenol 刺激に伴う FLJ00018 の移動度シフトが (Fig. 1-2E)、より顕著に見られ、FLJ00018 のリン酸化が示唆された (Fig. 1-2F)。FLJ00018 が EGFR transactivation により活性化されているという更なる証拠を得る為に、AG1478 を用いてイムノプロット解析を行った。Isoproterenol 刺激に伴う FLJ00018 の移動度シフトは、AG1478 前処理によって抑制された (Fig. 1-2G)。これらの結果より、FLJ00018 が EGFR transactivation 機構を介してセリン、スレオニンリン酸化され、活性化されることが示唆された。

3. FLJ00018 の EGF 刺激によるリン酸化と活性化

Figure 1-2において、FLJ00018 は GPCR による EGFR transactivation を介して活性化されることが示唆された。次に、EGF による EGFR の直接刺激によって FLJ00018 が活性化されるかを検討する為に EGFR と FLJ00018 を一過性に共発現させた NIH3T3 細胞を用いて SRE 活性を測定した。6 時間の EGF (20 ng/ml) 刺激により、非常に強い SRE 活性の上昇が見られた (Fig. 1-3A)。また、EGF シグナルによって活性化された FLJ00018 が、RhoGTPase のどのサブタイプを活性化するかを調べる為に、RhoGTPase のドミナントネガティブ変異体を用い、SRE 活性を測定した。ドミナントネガティブ変異体は G 蛋白質活性を欠いた、不活性化型変異体である。RhoA ドミナントネガティブ変異体は、EGFR を介した FLJ00018 による SRE 依存的転写活性にあまり影響を及ぼさなかったのに対し、Rac1 および Cdc42 のドミナントネガティブ変異体は EGFR を介した FLJ00018 による SRE 活性上昇を抑制した (Fig. 1-3B)。このこと

から、EGF 刺激によって活性化された FLJ00018 は G $\beta\gamma$ による活性化と同様に、Rac1, Cdc42 を特異的に活性化させることが示唆された。

次に、EGF 刺激時の、FLJ00018 の発現形態を確認したところ、EGF (20 ng/ml) 刺激により FLJ00018 の電気泳動上の移動度が高分子量側に変化した (Fig. 1-3C)。また、この移動度変化がリン酸化によるものかどうかを、アルカリリフォスファターゼ及び、Lambda フォスファターゼを用いて確認したことろ、アルカリリフォスファターゼ及び、Lambda フォスファターゼの処理により、EGF 刺激による FLJ00018 の電気泳動上の移動度シフトがみられなくなった (Fig. 1-3D)。さらに、Phos-tag ゲルを用いて HEK293 細胞における EGF 刺激を介した FLJ00018 の移動度シフトを確認したことろ、通常の電気泳動で見られた移動度シフトと比較して、より顕著な FLJ00018 の移動度シフトがみられた (Fig. 1-3E, F)。これらの結果から、FLJ00018 が EGF による直接刺激によっても、リン酸化を受けて活性化されることが示唆された。そこで、細胞内における EGF 刺激時の FLJ00018 リン酸化の時間変化について、FLJ00018 と EGFR を共発現させた細胞にさまざまな時間において EGF 刺激を加えることにより検討を行った。その結果、FLJ00018 は EGF 刺激後 2 分から 15 分の間で時間依存的にリン酸化され、5 分でピークに達した (Fig. 1-3G)。 β_1 AR 刺激による EGFR の活性化 (Fig. 1-2E) に比べ、EGF の直接刺激による FLJ00018 のリン酸化は非常に早い反応であり、この差が細胞機能の差にかかわっているかもしれないことを示唆している。EGFR は受容体型チロシンキナーゼであるので、FLJ00018 が EGFR によって直接チロシンリン酸化されるかを検討した。Figure 1-3H に示したように、Vav3 と EGFR を発現させた細胞では、EGF 刺激により、チロシンリン酸化 Vav3 が検出されたのに対し、EGFR、FLJ00018 を発現させた細胞への EGF 刺激では、FLJ00018 のチロシンリン酸化は検出されなかった。これらの結果は少なくともこの実験条件下においては、EGFR 刺激により、FLJ00018 はチロシンリン酸化より、むしろセリン、スレオニンリン酸化を受け、活性化されることを示唆している。



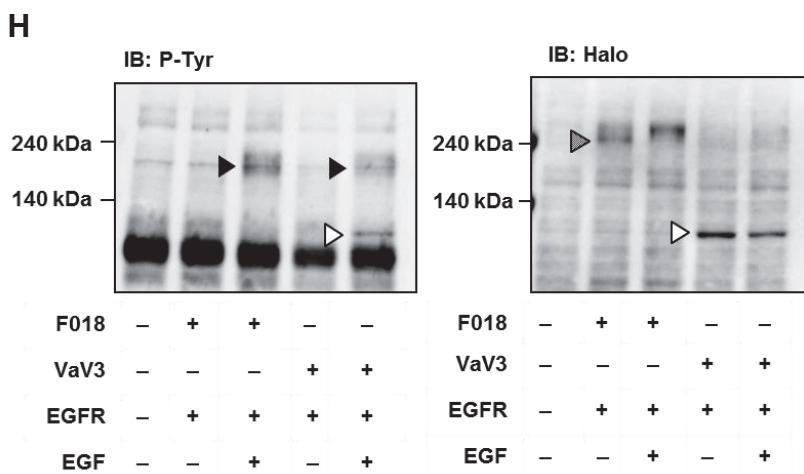


Fig. 1-3 FLJ00018 は EGF シグナルによって活性化される。

A, B, NIH3T3 細胞に pSRE.L-luciferase, pRL-SV40 プラスミド DNA, FLJ00018, EGFR, pF4A-RhoA T19N, pF4A-Rac T17N, pF4A-Cdc42 T17N の発現ベクターをそれぞれ示したようにトランسفエクションした。トランسفエクションした細胞に、20 ng/ml, 6 時間の EGF 刺激を行った。ルシフェラーゼ活性は dual-luciferase reporter assay system を用いて測定し、得られた活性は Mock を 1.0 として標準化した値を示した。実験は少なくとも 3 回行い、値を平均値± S.D. で示した。

C, E, G, H, NIH3T3 細胞 (C, G, H) 及び HEK293 細胞 (E) に EGFR, G $\beta_1\gamma_2$ そして Myc タグもしくは Halo タグを付加した FLJ00018, Halo タグが付加された Vav3 の発現ベクターを図に示したように一過性にトランسفエクションした。トランسفエクションを行った細胞に EGF (20 ng/ml) を用いて 15 分間 (C, E, H) もしくは、図に示した時間 (G) で刺激を行った。等量の蛋白質は 7.5% SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 の検出には Anti-Myc 抗体を、Halo タグが付加された蛋白質の検出には Anti-Halo 抗体を、リン酸化チロシンを含む蛋白質の検出には Anti-P-Tyr (PY20) 抗体を用いた。

D, NIH3T3 細胞に、EGFR、Myc タグを付加した FLJ00018 の発現ベクターを図に示したように一過性にトランسفエクションした。トランسفエクションを行った細胞に 20 ng/ml の EGF 刺激 (15 分間) を行った。細胞の溶解後、溶解液に、アルカリフォスファターゼ (10 unit) もしくは、Lambda フォスファターゼ (400 unit) を加え、30°C、2 時間反応させた。反応は、SDS サンプルバッファーを加えることで停止させ、それぞれの蛋白質のリン酸化状態をイムノプロットによって確認した。

F, HEK293 細胞に EGFR、Myc タグを付加した FLJ00018 の発現ベクターを図に示したように一過性にトランسفエクションした。トランسفエクションを行った細胞に 20 ng/ml の EGF 刺激 (15 分間) を行った。等量の蛋白質を 13 μ M Phos-tag AAL107, 26 μ M MnCl₂, 1.5% アガロースを加えた 3% SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 を検出する為にイムノプロットは Anti-Myc 抗体を用いて行った。

4. FLJ00018 の H-Ras を介する活性化

次に、EGF による FLJ00018 の活性化に、どのようなシグナル分子の関与があるかについて検討を行った。一般的に、EGFR の下流で Ras-MAPK カスケードが活性化されることが知られている (38)。そこで、NIH3T3 細胞に FLJ00018 と恒常的活性化型 H-Ras (H-Ras CA)、もし

くは H-Ras ドミナントネガティブ変異体 (H-Ras DN) を共発現させ、イムノプロット解析を行った。H-Ras CA との共発現により、FLJ00018 の移動度シフトが見られた (Fig. 1-4A)。また、H-Ras DN との共発現により EGF 刺激 (20 ng/ml) による FLJ00018 の移動度シフトの抑制が見られた (Fig. 1-4B)。これらの結果から H-Ras が EGF 刺激に伴う FLJ00018 の活性化に関与していることが示唆された。

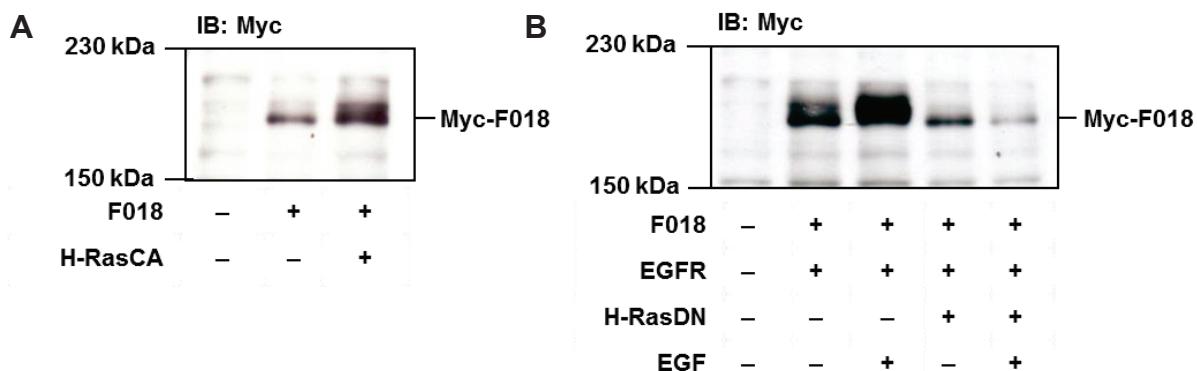


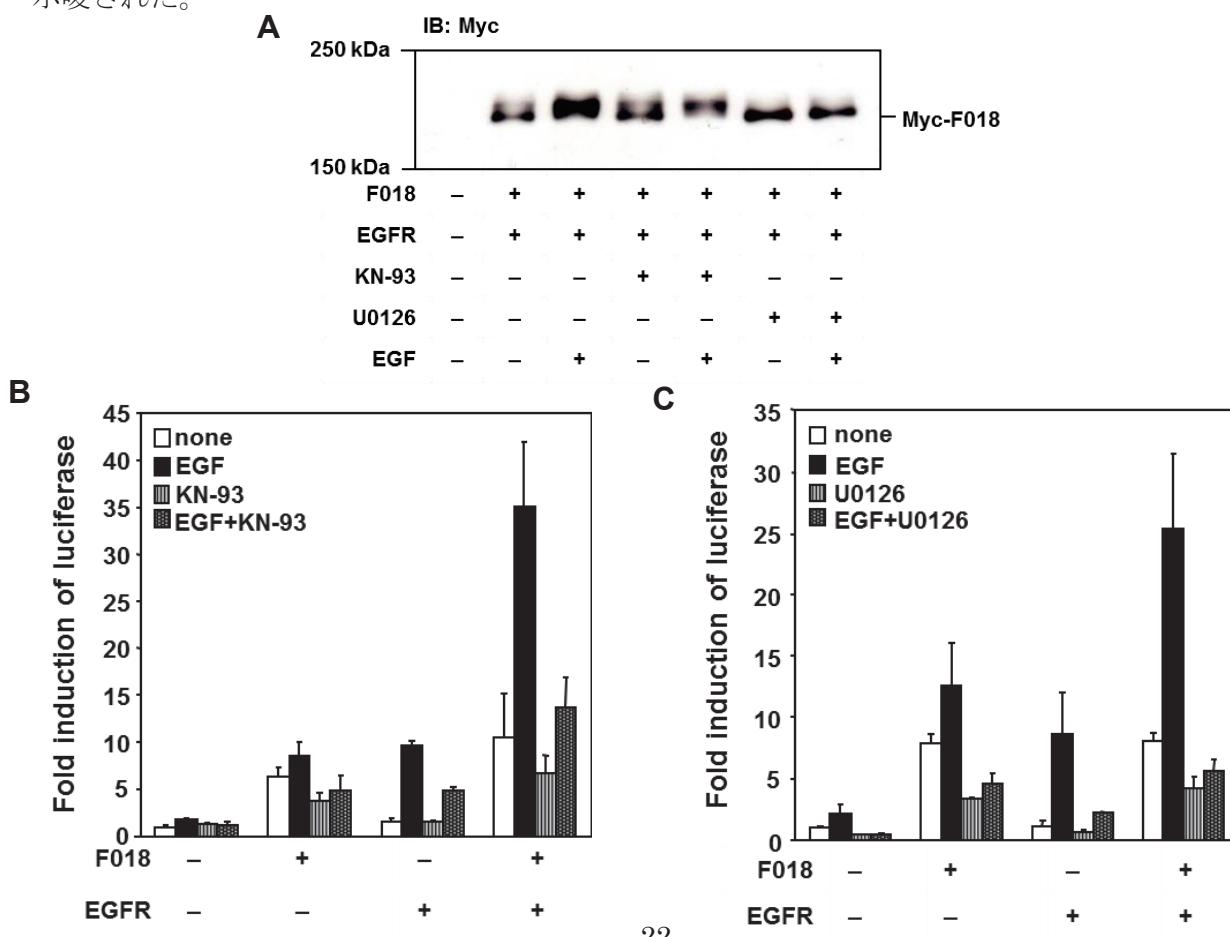
Fig. 1-4 FLJ00018 は H-Ras を介して活性化される。

A, B, NIH3T3 細胞に EGFR, 恒常的活性化型 H-Ras (H-Ras CA), ドミナントネガティブ型 H-Ras (H-Ras DN), そして Myc タグを付加した FLJ00018 の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションを行った細胞に 20 ng/ml, 15 分間の EGF 刺激を行った。等量の蛋白質は 7.5% SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用いた。

5. FLJ00018 の H-Ras/MAPK 経路を介する活性化

EGFR-H-Ras の下流では、MAPK カスケードが働くことが考えられることから、MAPK カスケードの中の MEK に対する阻害剤である U0126 (10 μM) を 30 分間前処理後、EGF 刺激を行い (20 ng/ml, 15 分間)、イムノプロット法を用いて FLJ00018 の電気泳動上の移動度シフトを検討した。対照として用いた、カルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) の阻害剤 KN-93 (10 μM) 処理細胞では、EGF 刺激に伴い、FLJ00018 の移動度シフトが見られたのに対し、U0126 (10 μM) 处理細胞においては、EGF 刺激による移動度シフトの抑制が見られた (Fig. 1-5A)。この結果から FLJ00018 が MEK もしくはその下流のリン酸化酵素によってリン酸化されることが示唆された。さらに、U0126 (10 μM, 1 時間) もしくは、KN-93 (10 μM, 1 時間) 処理を行った細胞を用いて、SRE 活性測定を行ったところ、どちらの阻害剤を用いた場合にも EGF 刺激に伴う SRE

活性の上昇の抑制が見られた (Fig. 1-5B, C)。これらの結果は、KN-93 前処理を行った細胞で EGF 刺激による FLJ00018 の移動度シフトの抑制が見られなかった結果と一致しない。これは、MEK もしくはその下流のリン酸化酵素は FLJ00018 のリン酸化と SRE 活性の両方に影響を与えるのに対し、CaMKII は、MEK が FLJ00018 をリン酸化する経路とは別の経路を介し、FLJ00018 リン酸化には影響をせず、SRE にのみ影響を及ぼしていることが考えられた。CaMKII が、EGF 刺激による FLJ00018 を介した SRE 活性の抑制に関与することから、EGF の下流において、他の MAPK が働いているかを検討した。FLJ00018 と EGFR を共発現させた細胞に、p38-MAPK 阻害剤、SB202190 及び、JNK 阻害剤、SP600125 を 30 分前処理した後、EGF 刺激を行い、FLJ00018 の電気泳動上の移動度シフトを確認した。その結果、どちらの阻害剤も、EGF 刺激による FLJ00018 の移動度シフトに影響は見られなかった (Fig. 1-5D)。また同様に、FLJ00018 を介した SRE 依存的遺伝子転写活性への p38-MAPK 及び JNK の影響についても検討を行った。しかしながら、どちらのキナーゼ阻害剤も、SRE 活性に対する影響は見られず (Fig. 1-5E)、これら 2 つのキナーゼ経路は FLJ00018 のリン酸化及び活性化に影響を与えないことが示唆された。



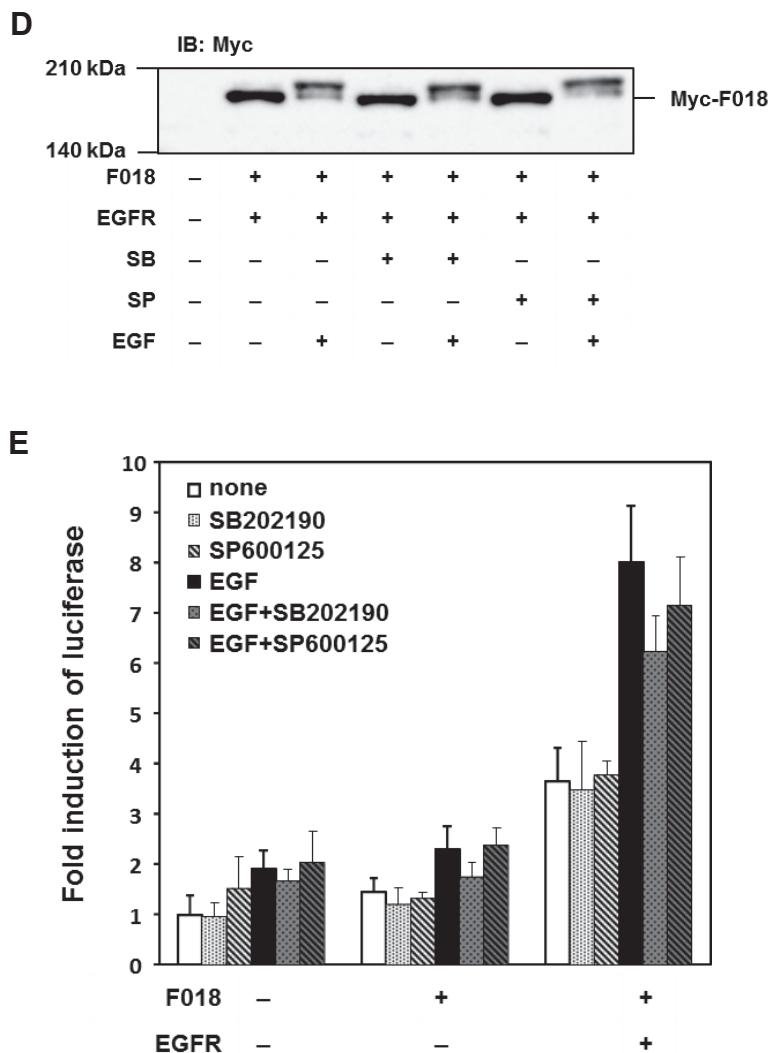


Fig. 1-5 FLJ00018 は MAPK 経路を介して活性化される。

A, D, NIH3T3 細胞に EGFR, Myc タグを付加した FLJ00018 の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション後、細胞に CaMK II 阻害剤、KN-93 (10 μM, A)、MEK 阻害剤、U0126 (10 μM, A) もしくは、p38MAPK 阻害剤、SB202190 (10 μM, D)、JNK 阻害剤、SP600125 (10 μM, D) を 30 分間処理後、終濃度 20 ng/ml, 15 分間の EGF 刺激を行った。等量の蛋白質を 7.5% SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用いた。

B, C, E, NIH3T3 細胞に pSRE.L-luciferase, pRL-SV40 プラスミド DNA, FLJ00018, EGFR の発現ベクターをそれぞれ示したようにトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞に、10 μM の KN-93 (B)、10 μM の U0126 (C) もしくは、10 μM の SB202190 (E)、10 μM の SP600125 (E) を 1 時間前処理後、終濃度 20 ng/ml の EGF 刺激を 6 時間行った。ルシフェラーゼ活性は dual-luciferase reporter assay system によって測定し、得られた活性は Mock を 1.0 として標準化した値を示した。実験は少なくとも 3 回行い、値を平均値± S.D. で示した。

6. EGF 刺激を介した FLJ00018 リン酸化に関わる構造の同定

次に、EGF 刺激による FLJ00018 のリン酸化に関わる構造を調べる為に、FLJ00018 の各種欠損変異体を EGFR と共に発現させた細胞を用いてイムノプロット解析により FLJ00018 の移動

度シフトを検討した。Figure 1-6A に FLJ00018 の各変異体の構造を示した。Figure 1-6B に示したように、FLJ00018 WT と FLJ00018 P1 変異体を EGFR と共に発現させた細胞では EGF 刺激伴い、移動度シフトが見られた。一方で、FLJ00018 P1.5, FLJ00018 P2, FLJ00018 P3, FLJ00018 ΔN を EGFR と共に発現させた細胞においては刺激に伴う明確な移動度シフトはほとんど見られなかった。この結果から EGF 刺激による FLJ00018 のリン酸化に関わるアミノ酸の少なくとも 1 つは、FLJ00018 の 616-970 番目のアミノ酸配列内に存在する可能性が示唆された。

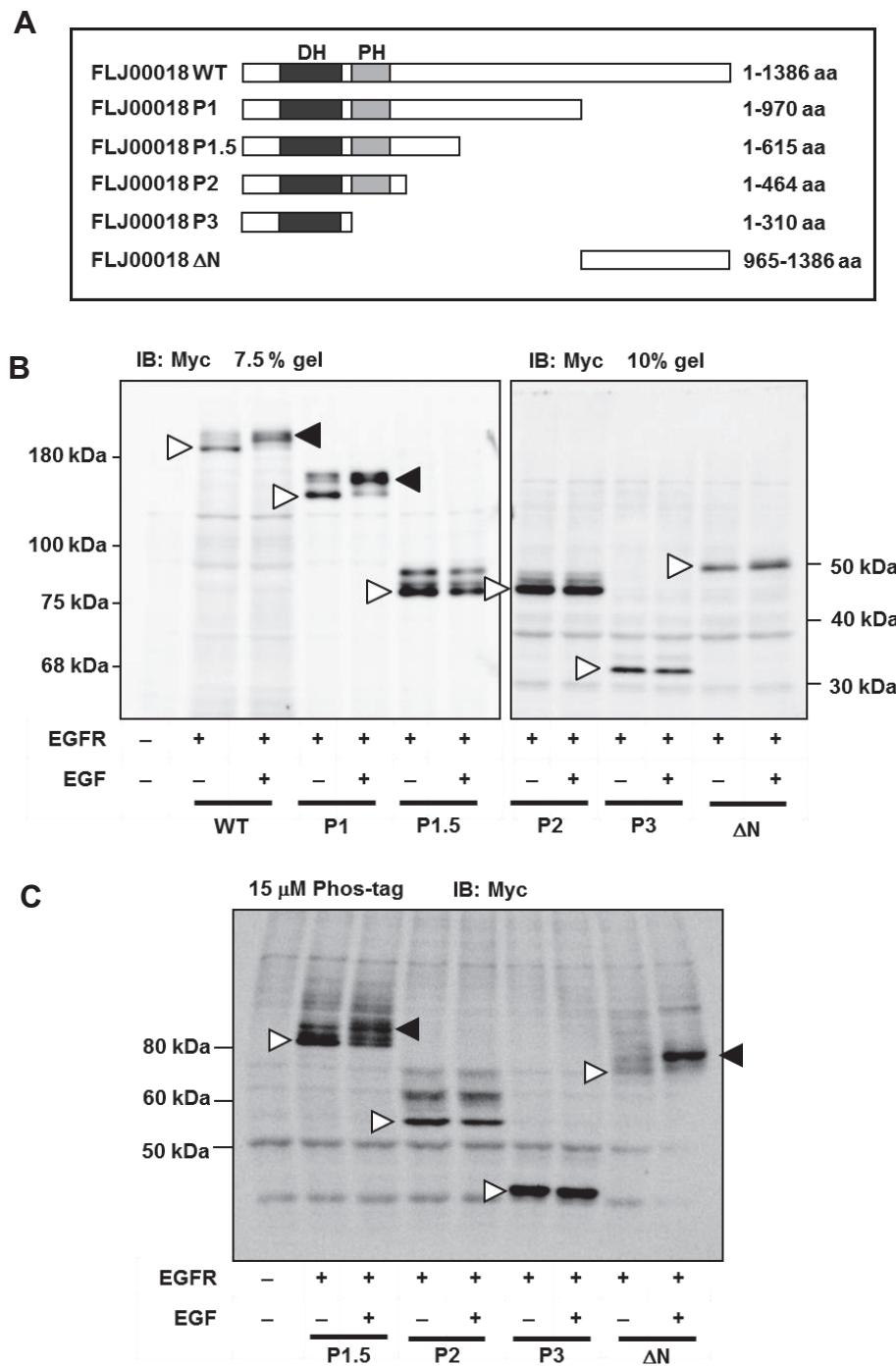


Fig. 1-6 EGF 刺激による FLJ00018 リン酸化に関わる構造の同定

A, FLJ00018 の各種変異体の構造。WT, P1, P1.5, P2, P3, ΔN コンストラクトは、それぞれ FLJ00018 の 1-1386, 1-970, 1-615, 1-464, 1-310, 965-1386 アミノ酸残基が含まれる。

B, NIH3T3 細胞に EGFR, Myc タグを付加した FLJ00018 各種変異体の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞に EGF (20 ng/ml) を用いて 15 分間刺激を行った。等量の蛋白質を 7.5% SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用いた。▲, 移動度変化の見られたバンド。△, 刺激前の FLJ00018 のバンド。

C, NIH3T3 細胞に EGFR, Myc タグを付加した FLJ00018 の各種変異体の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションを行った細胞に 20 ng/ml の EGF 刺激 (15 分間) を行った。等量の蛋白質を 15 μM Phos-tag AAL107, 30 μM MnCl₂ を加えた 6% SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 を検出する為にイムノプロットは Anti-Myc 抗体を用いて行った。△, 刺激前の FLJ00018 のバンド。▲, 刺激により移動度変化の見られた FLJ00018 のバンド。

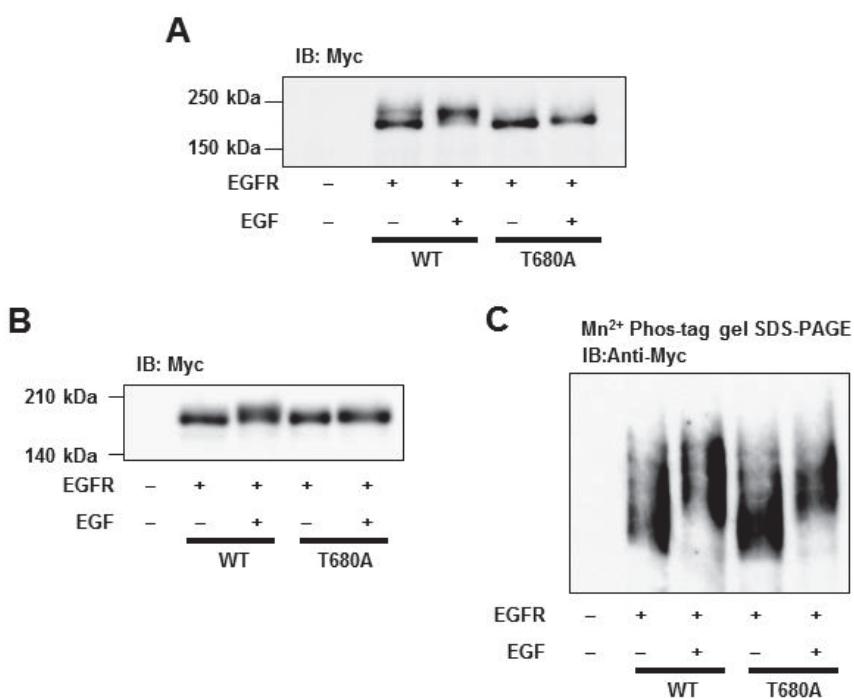
そこでさらに、P1.5, P2, P3, ΔN の配列中に EGF 刺激によるリン酸化に関わる構造が存在するかどうかを Phos-tag ゲルを用いて確認した。その結果、Phos-tag ゲル中において、P1.5, ΔN を含む細胞への EGF 刺激により、移動度シフトが確認された (Fig. 1-6C)。これらの結果から、FLJ00018 の 616-970 番目のアミノ酸配列以外に 465-615, 965-1386 番目のアミノ酸配列にも、EGF 刺激によってリン酸化される領域が存在する可能性が示唆された。しかしながら、P2, P3 を比較すると、P2 では移動度の異なる複数のシグナルが検出され、このような変化は P3 では見られなかった。このことから、311-464 番目のアミノ酸配列にもリン酸化される構造が含まれる可能性が否定できず、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

7. EGF 刺激による FLJ00018 リン酸化に関わるアミノ酸の同定

Figure 1-5において、FLJ00018 は EGF 刺激により、MEK の下流の分子によってリン酸化を受けることが示唆され、Figure 1-6において、そのリン酸化にかかわる部位の少なくとも一つは、FLJ00018 の 615-970 番目のいずれかがかかる可能性が示唆された。そこで、この領域において、MEK の標的分子の一つである、ERK によるリン酸化のコンセンサス配列 (44) を調べたところ、FLJ00018 の 680 番目のスレオニンが推定された。そこで、この 680 番目のスレオニンをアラニンに置換した点変異体 (FLJ00018 T680A) を作製し、EGF 刺激による電気泳動上の移動度シフトをイムノプロット解析により検討した (Fig. 1-7A)。その結果、FLJ00018 T680A 変異体は、FLJ00018 WT と比べ、EGF 刺激による移動度シフトの抑制がみられた。

FLJ00018 の 680 番目のスレオニン残基において、FLJ00018 がリン酸化されることをさらに確かめる為、HEK293 細胞に EGFR 及び、FLJ00018 WT または FLJ00018 T680A を導入し (Fig. 1-7B)、Phos-tag ゲルによる解析を行った。その結果、phos-tag ゲル中において、FLJ00018 WT と比較し、FLJ00018 T680A の EGF 刺激による移動度シフトが弱められることが明らかとなった (Fig. 1-7C)。これらのことから、EGF 刺激によって活性化された ERK によって FLJ00018 のスレオニン 680 番目がリン酸化されることが示唆された。しかしながら、EGF 刺激に伴い、FLJ00018 T680A にもわずかに残る移動度シフトがみられ、このことは FLJ00018 の 680 番目以外のアミノ酸配列上において、EGF 刺激によってリン酸化されるアミノ酸が存在するかもしれないことを示唆している。

FLJ00018 の 680 番目のスレオニン残基のリン酸化が FLJ00018 の活性に与える影響について検討をする為、SRE 活性測定を行った。Figure 1-7D に示す様に、FLJ00018 T680A の EGF 刺激による SRE 活性上昇は、FLJ00018 WT と比べ変化が見られなかった。また、各種 Rho のドミナントネガティブ変異体を用い、FLJ00018 T680A が RhoGTPase に与える影響の検討を行った。しかしながら、FLJ00018 T680A は、FLJ00018WT と同様に (Fig. 1-3B) Rac, Cdc42 に対して活性を有しており、RhoGTPase へ与える影響についても変化が見られなかった (Fig. 1-7E)。



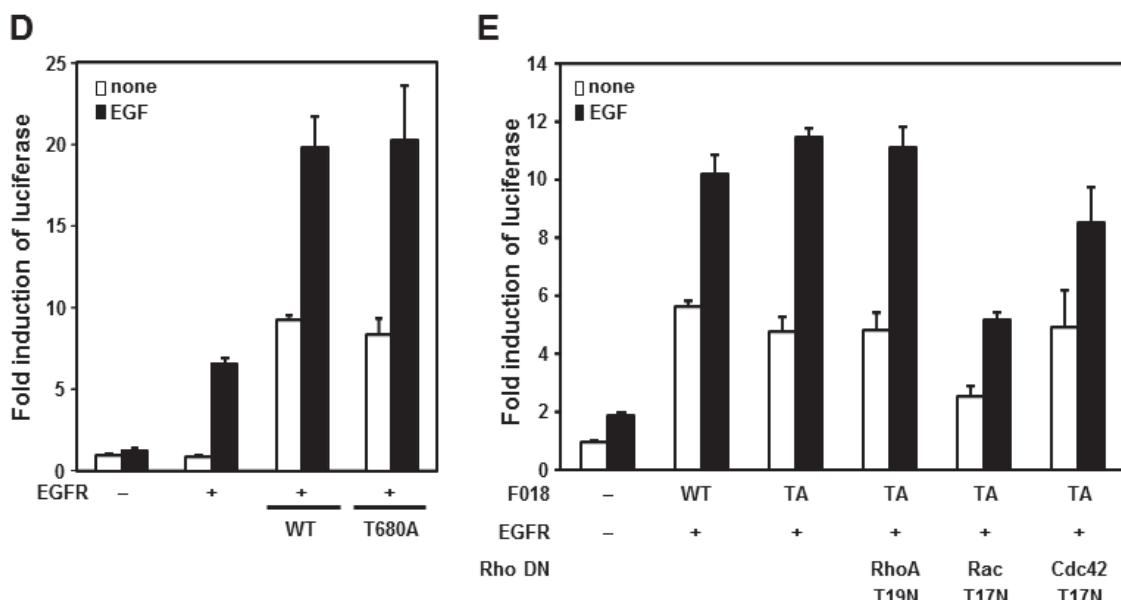


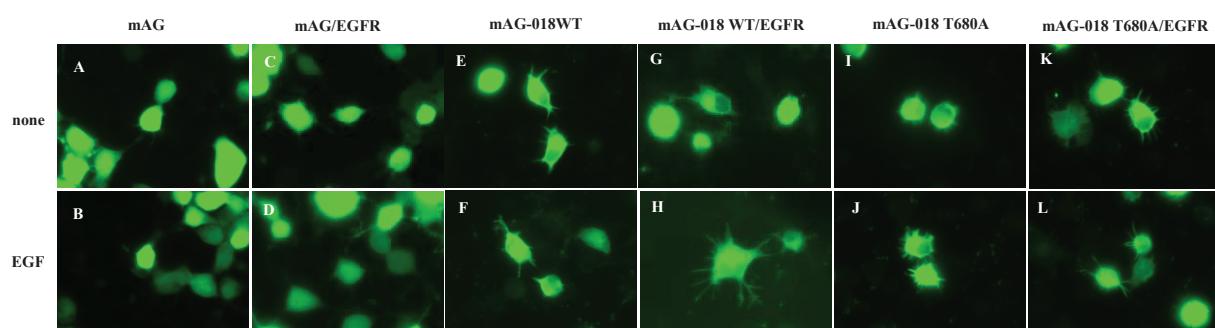
Fig. 1-7 EGF 刺激による FLJ00018 リン酸化に関わるアミノ酸の同定

A, B, NIH3T3 細胞 (A) または HEK293 細胞 (B) に EGFR, Myc タグを付加した FLJ00018 の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞に EGF (20 ng/ml) を用いて 15 分間刺激を行った。等量の蛋白質を 7.5% SDS-PAGE で分離した。イムノプロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用いた。

C, HEK293 細胞に EGFR, Myc タグを付加した FLJ00018 の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションを行った細胞に 20 ng/ml の EGF 刺激 (15 分間) を行った。等量の蛋白質を 13 μM Phos-tag AAL107, 26 μM MnCl₂, 1.5% アガロースを加えた 3% SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 を検出する為にイムノプロットは Anti-Myc 抗体を用いて行った。

D, E, NIH3T3 細胞に pSRE.L-luciferase, pRL-SV40 プラスミド DNA, FLJ00018, EGFR, pF4A-RhoA T19N, pF4A-Rac T17N, pF4A-Cdc42 T17N の発現ベクターをそれぞれ示したようにトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞に、20 ng/ml, 6 時間の EGF 刺激を行った。ルシフェラーゼ活性は dual-luciferase reporter assay system を用いて測定し、得られた活性は Mock を 1.0 として標準化した値を示した。実験は少なくとも 3 回行い、値を平均値 ± S.D. で示した。

8. EGF 刺激を介した FLJ00018 による神経突起形成と細胞伸展



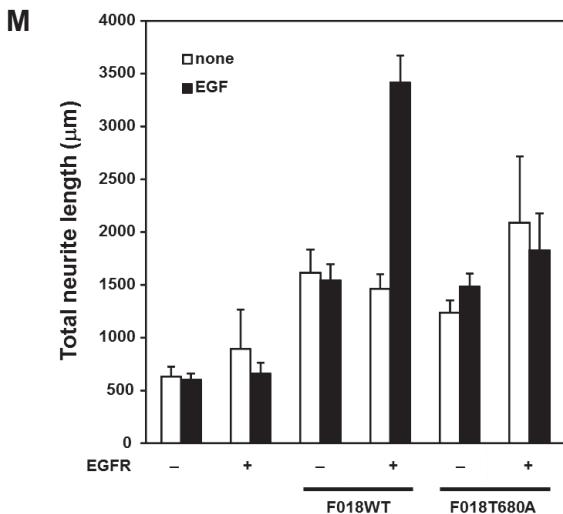


Fig. 1-8 EGF を介した FLJ00018 リン酸化は神経突起伸長と細胞形態変化を引き起こす。

A-L, Neuro-2a 細胞に単量体で働く蛍光蛋白質 mAG, mAG を付加した FLJ00018 および EGFR の発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションの 3 時間後、細胞を 5% FBS で刺激し、一晩培養した。翌日、細胞を無血清培地に置き換え、20 ng/ml の EGF 刺激を行った。刺激 24 時間後、細胞を 4% パラホルムアルデヒド固定し細胞形態の観察を行った。

M, 各 sample から、無作為に選択した 10 枚の蛍光画像を取得し、それぞれ合計 50 細胞の細胞について突起様の構造の長さの合計を解析した。細胞の計測は Image J ソフトウェアを用いて行った。

いくつかの RhoGEF が神経突起形成のような細胞形態制御に関与するという報告がある (29,45)。そこで、EGF 刺激による、FLJ00018 の活性化が神経突起形成に関与するかどうかについて検討した。まず、Neuro-2a 細胞に FLJ00018, EGFR を共発現させ、EGF 刺激 (20 ng/ml, 24 時間) を行い、イムノプロット解析による FLJ00018 の蛋白質発現解析を行った。その結果、NIH3T3 や HEK293 細胞同様、EGF 刺激により FLJ00018 の移動度シフトが見られた (データには示さない)。そこで次に、Neuro-2a 細胞に単量体で働く新規の蛍光蛋白質アザミグリーン (mAG) (32) および mAG タグ化した FLJ00018 (mAG-FLJ00018) を EGFR と共に発現させ、細胞形態変化を観察した。その結果、FLJ00018 WT と EGFR を共発現させた細胞において、EGF 刺激により細胞伸展と細胞突起形成がみられた (Fig. 1-8G, H)。一方、FLJ00018 リン酸化部位を欠損させた mAG-FLJ00018 T680A を EGFR と共に発現させても、FLJ00018 WT で見られた様な EGF 刺激による細胞形態変化は引き起こさなかった (Fig. 1-8K, L)。FLJ00018 のスレオニン 680 番目のリン酸化が細胞形態変化に関わることを確かめる為、それぞれの試料について、画像解析ソフトを使用した統計解析を行った。Figure 1-8M に示す様に、FLJ00018 WT 及び

EGFR を共発現させた細胞中の神経突起様の構造の合計の長さは、FLJ00018 T680A と EGFR を共発現させた場合より、長いことが明らかとなった。これらの結果より、EGF 刺激による FLJ00018 のスレオニン 680 番目のリン酸化は、EGF 刺激による神経突起伸長や細胞伸展に重要であることが示唆された。

第4節 考察

過去、FLJ00018 が三量体 G 蛋白質の G $\beta\gamma$ サブユニットと直接結合することにより活性化され、RhoGTPase の Rac1, Cdc42 を活性化することが報告された (23)。本研究において FLJ00018 は、 β_1 AR を介した EGFR transactivation によっても活性化されることを示した (Fig. 1-2)。これまで endothelin, thrombin, calbachol, LPA を含む、いくつかの GPCR アゴニストが EGFR transactivation に関わることが示唆されている。また、GPCR を介する EGFR transactivation のシグナル伝達経路は、細胞種や、細胞がおかれる環境によって異なることから、様々なシグナル分子の関与が提唱されている。この内、最も解明が進んでいるシグナル伝達経路は、ADAM/heparin-binding EGF (HB-EGF) による EGFR の活性化機構である。LPA 受容体が、エンドジナスなレベルで発現している場合、LPA 受容体が HB-EGF 依存的な EGFR 活性化を介して phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) 及び、PI3K/AKT 経路を活性化する (46)。一方、 β_2 AR は、c-Src 及び、EGFR の活性化を介して ERK 経路を活性化するが、PLC γ 1 や、PI3K/AKT 経路は活性化されないという報告もある (47)。この活性化機構に加え、 β AR 刺激を介する EGFR transactivation は、いくつか研究グループによって、複数の機構を介して引き起こされているということが提唱されている。Dakka らは、 β_2 AR ゴニスト刺激により Gs シグナルから Gi シグナルへの変換が生じ、Gi シグナルが G $\beta\gamma$, Src を介して Ras/MAPK 経路が活性化されることを見出している (48)。しかしながら、他のグループによって、Gs/Gi スイッチング非依存的に Src を介して EGFR/MAPK の活性化が生じることが報告されている (49)。さらに、GRK5 および、GRK6/ β -arrestin/Src/EGFR という経路を介する transactivation 機構の存在も示唆されている (40)。これらの報告は、 β AR を介して EGFR transactivation によって Ras-MAPK 経路が活性化されるという今回の発見と一致しており、FLJ00018 が β AR を介して活性化された EGFR/Ras/MAPK によってリン酸化される経路の存在の可能性と矛盾しない。しかしながら、本研究では、 β_1 AR の下流において、どのような経路を介した EGFR の transactivation が起きているのか、詳細を検討することができなかった。

Vascular smooth muscle 細胞において、Thrombin による protease-activated receptors 1 (PAR1) の活性化を介した EGFR transactivation が生じる。この Thrombin による EGFR の活

活性化により、RhoA が活性化される (50)。このことは、EGFR transactivation 依存的な経路を介して RhoGEF が活性化される可能性を示唆している。しかしながら、 β_2 AR/Gi 刺激によって、Src を介して血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR)/PI3K シグナルが活性化されるという報告もある (39)。さらに、 β_1 AR と EGFR の相互作用への β -アレスチンの結合が、EGFR の独立した活性化と EGFR transactivation による活性化におけるシグナルの違いを生じさせているという報告がある (42)。実際、本研究において、FLJ00018, β_1 AR 及び β -ARKct を共発現させた場合、 β_1 AR 刺激による SRE 活性が完全には抑制されなかった。また、FLJ00018 T680A の電気泳動上の移動度シフトは、FLJ00018 WT に比べ、完全には抑制されず、SRE 活性にも変化が生じなかつたことから、 β_1 AR 刺激時に EGFR transactivation を含む複数のシグナルが同時に働くていることも考えられる。

本研究ではまた、FLJ00018 が EGFR の直接刺激によっても活性化されることを示した (Fig. 1-3)。EGF 刺激による FLJ00018 の活性化には、Ras-MAPK 経路が関わっており (Fig. 1-4, 1-5)、この経路によって FLJ00018 がリン酸化を受けることを示した (Fig. 1-5)。EGFR に限らず、増殖因子受容体や神経成長因子受容体の下流においてリン酸化される RhoGEF はこれまでにいくつか見いだされている (27)。たとえば、RhoGEF の一種、Asef は、EGFR シグナルの下流において Src ファミリーキナーゼ依存的な経路によって Tyr 94 がリン酸化されることが報告されている (28)。リン酸化された Asef は Rac1, Cdc42 を活性化する。一方、別の RhoGEF である β PIX は、FGFR のシグナルの下流で働く Ras-ERK-Pak2 経路によって、Ser 525 と Thr 526 がリン酸化をうけることが報告されている (29)。リン酸化された β PIX は PC12 細胞内で神経突起伸長を引き起こす。 β PIX はさらに、EGFR の下流においてもリン酸化されることが報告されており、このリン酸化には Src ファミリーキナーゼによる Tyr 442 のリン酸化が関与している (51)。増殖因子受容体シグナルの下流の分子による RhoGEF のリン酸化は Rac1, Cdc42 に対する GEF に加え、RhoA に対する GEF である GEF-H1 も ERK1/2 により、Thr 678 がリン酸化される (52)。このように RhoGEF が増殖因子受容体や神経栄養因子受容体によって活性化されるという報告は複数なされており、RhoGEF の活性制御は GPCR だけでなく、EGFR シグナルの様な成長因子受容体による制御も生体内では一般に起きているのかもしれない。

いくつかの RhoGEF の活性化により神経突起伸長が引き起こされることが明らかになりつつある。Tiam1 は、脳で機能している神経成長因子受容体 TrkA や TrkB によって活性化される。NGF による TrkA の活性化に続き、Tiam1 が Ras と結合し、その下流において Rac の活性化を介した神経突起伸長が引き起こされる (53)。また、Burridge らのグループは、EGF 刺激によって RhoG が活性化することを示し、RhoG の活性化には、Vav ファミリー RhoGEF 及び、RhoG 特異的 RhoGEF の一種、Trio が、RhoG 依存的な経路を介して神経突起伸長に関与することが示されている (55)。これらの報告と一致して、本研究においても、Ras/MAPK 経路によってリン酸化された FLJ00018 が、神経突起の伸長に関わっていることを示した。FLJ00018 は生体内に広く発現がみられ、脳においてもその発現が見られることから、今回見られたこの FLJ00018 のリン酸化による突起伸長は、生体内でも生じている現象なのかもしれない。しかしながら、先にも述べたように、EGF シグナルによるリン酸化部位を変異させた FLJ00018 T680A は、突起伸長は見られなくなるものの、RhoGTPase に対する活性に変化は見られなかった。680 番目のリン酸化は、直接的な Rho に対する活性ではなく、細胞内局在や構造の変化に関わっている可能性もあり、今後詳細な検討今後詳細な検討が必要と考えられた。また、先の β PIX の例にみられるように、シグナル伝達経路の種類により、リン酸化されるアミノ酸残基は異なっており、一つの RhoGEF 分子は複数のリン酸化されうるアミノ酸残基を持っていることが予想される。このことは、リン酸化されるアミノ酸残基の位置により、下流のシグナル伝達経路が異なる可能性を示唆している。本研究で見いだされた EGF シグナルによる FLJ00018 のリン酸化も、リン酸化部位により、遺伝子転写活性に関わるリン酸化や細胞局在の変化に関わるリン酸化等、下流のシグナル伝達経路や細胞機能へ与える役割も異なっているのかもしれない。今後、FLJ00018 のリン酸化やリン酸化の部位によるシグナル伝達機構の違いの詳細を解明することにより、アクチン細胞骨格再構築機構やその破綻とともにがんや神経疾患の解明に役立つと考えらる。

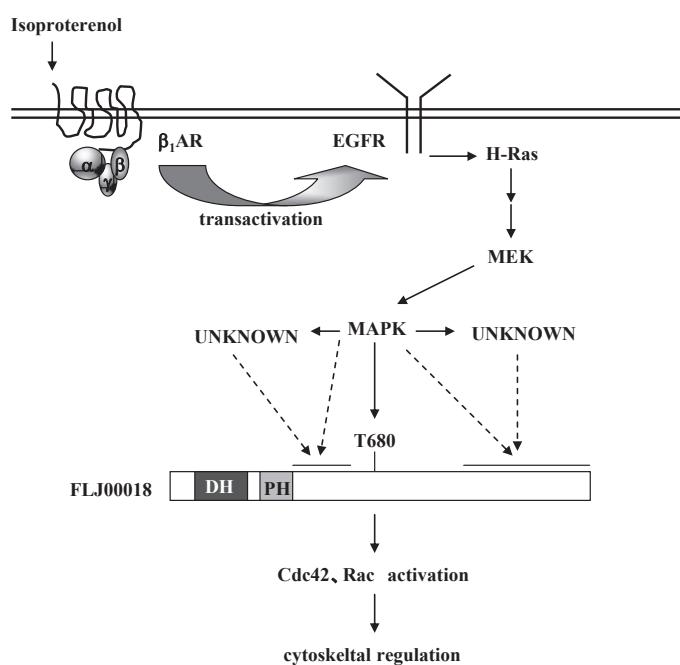


Fig. 1-9 本研究で見いだされた EGFR transactivation を介した FLJ00018 のリン酸化と活性化機構。β₁AR 刺激により EGFR transactivation が誘導される。活性化された EGFR は、MAPK カスケードを介して、FLJ00018 のリン酸化を引き起こす。FLJ00018 は、MAPK 経路における ERK1/2 によって 680 番目のスレオニン残基にリン酸化を受ける。FLJ00018 はさらに、MAPK もしくは MEK の下流の他の分子によって 465-615 番目、965-1386 番目のセリン/スレオニン残基も同時にリン酸化を受ける可能性が示唆された。リン酸化された FLJ00018 は RhoGTPase の Cdc42, Rac1 を活性化し、細胞形態変化と神経突起生成を引き起こす。

第2章 非受容体型チロシンキナーゼ Src を介したチロシンリン酸化

第1節 緒言

前章では、FLJ00018 が、EGFR 受容体刺激を介した Ras-MAPK 経路によってスレオニンリン酸化を受けることを示した。EGF 刺激を介した FLJ00018 のリン酸部位は複数存在することが考えられたが、EGF 刺激下では、FLJ00018 はチロシンリン酸化されないことが示唆された。一般的に、蛋白質においてリン酸化されるアミノ酸は、セリン、スレオニン、チロシンである。しかし、実際の生体内では、セリン、スレオニンへのリン酸化が、90%以上を占め、チロシンのリン酸化はほんの数%と考えられている。しかし、チロシンのリン酸化はシグナル伝達において重要な役割を果たしていると考えられている。蛋白質チロシンリン酸化を担うチロシンキナーゼは、受容体型チロシンキナーゼ (RTK) と非受容体型チロシンキナーゼに大別される。RTK は前章で述べた EGFR を含み、神経栄養因子受容体 (Trk)、インスリン受容体 (IGFR)、線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR)、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR)、血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR)、幹細胞増殖因子受容体 (HGFR) などが知られている。非受容体型チロシンキナーゼには、接着斑キナーゼ (FAK) や Src ファミリーなどがある。FAK は、フィブロネクチンやコラーゲンといった細胞外基質分子と結合する接着分子であるインテグリンからのシグナル受け取り、paxillin や p130Cas といった基質をリン酸化することで、細胞接着による細胞の運動性の変化に関与する。FAK は、細胞増殖や生存、浸潤などのがんの特性に非常に重要であると考えられており、実際、乳癌や甲状腺癌、卵巣癌、肺癌、大腸癌など様々な癌腫で過剰発現が見られる (56-62)。Src ファミリーは、チロシンキナーゼ活性をもつ酵素として初めて同定され、Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr などが知られている。活性化型変異により細胞をがん化させるがん遺伝子の 1 つとして知られており、標的蛋白質のチロシン残基をリン酸化することにより、そのリン酸化チロシンと Src homology 2 (SH2) ドメインを持つ蛋白質との相互作用や、リン酸化蛋白質の活性調節を通じて、下流へシグナルを送ることが知られている (63-66)。

このように、蛋白質のチロシンリン酸化は、細胞の癌化を含めた多くの重要な役割を果たすこ

とが考えられる。前章でも述べたように、他の RhoGEF についても、リン酸化による活性調節が報告されている。特に、Tiam や Cool-1 は、Src によってリン酸化されることで活性調節を受ける (51,67)。また、同様に Rac に対する GEF である Vav2 も Src によるリン酸化を受けることが報告されている (68)。これらのことから、FLJ00018 も Src による調節を受ける可能性が考えられる。そこで、本章では、非受容体型チロシンキナーゼ Src に着目し、Src による FLJ00018 のチロシンリン酸化及び、リン酸化による FLJ00018 の機能調節について検討を行った。

第2節 実験材料および方法

1. プラスミドと試薬

pF1K ベクターに組み込まれた ABL1, PIK3R3, EphA1, EphA3, EphA5, EphB2 は、かずさ DNA 研究所より供与された。これらの遺伝子は、PCR 法及び、制限酵素処理を用いて、 pF5A-CMV-neo-Flag ベクターに組み込まれた。pSUEamp-cSrc は、Millipore から購入した。 pSUEamp-cSrcCA は、pSUEamp-c-Src を鋳型にし、PCR 法 (Stratagene) を用いて作製した。 pFN21A-Myc ベクターに組み込まれた FLJ00018 の各種欠損変異体及び点変異体は、 pFN21A-Myc-FLJ00018 WT を鋳型とし、PCR 法 (Stratagene) 及び、制限酵素を用いて作製した。pSRE.L-luciferase reporter は、Stratagene から、pRL-SV40 は、Nippon Gene から購入した。Src 特異的阻害剤 PP2 は、Tocris から、ABL 特異的阻害剤 GNF-2 は、Sigma-Aldrich から購入した。

2. 細胞培養とトランスフェクション

HEK293 細胞は、37°C, 5% CO₂ 加湿大気圧下で、10% FBS を添加した DMEM で培養した。一過性のトランスフェクションは Lipofectamine2000 試薬を用いて製品の使用法に従って行った (Life Technologies)。SRE 依存的遺伝子転写活性測定には 0.4 μg の DNA を、イムノブロット解析には 1 μg の DNA を、免疫沈降法には 2 μg の DNA を用いた。トランスフェクション後、細胞を 37°C で 6-8 時間培養し、その後、細胞を無血清培地に置き換え、16-18 時間培養した。

3. SH2 ドメインアレイ

各種 SH2 ドメイン発現クローンは、N 末端 Halo-tag/His 融合蛋白質として構成された。SH2 ドメインをコードする DNA フラグメントはヒト SH2 ドメインコレクション (Open Biosystems から購入) をテンプレートとして、PCR を用いて増幅し、pFN18A ベクターに組み込まれた。SH2 ドメイン発現クローンを導入した大腸菌 KRK 株を培養後、Halo-tag SH2 ドメインは Ni-NTA アガロースを用いて精製された。SH2 ドメインアレイを行うために、200-300 ng の精製蛋白質を HaloLink Protein Array slide (Promega) に固定した。使用前、固定されてい

ない蛋白質は、0.05% IGEPAL CA630 (sigma) を含む、PBS で洗浄した。FLJ00018 の 489 番目のリン酸化チロシン残基と結合する SH2 ドメイン含有蛋白質を調べる為に、Myc タグをつけた FLJ00018 WT と FLJ00018 Y489F 変異体を HEK293 細胞内にそれぞれ発現させ、10 µl/well の細胞ライセートを SH2 ドメインアレイに用いた。洗浄後、SH2 アレイに結合した Myc-FLJ00018 蛋白質を抗 Myc 抗体で検出した。

4. イムノプロット解析

トランスフェクションを行った細胞を各図に示した濃度と時間により各種阻害剤処理後、細胞を氷冷 PBS で一回洗浄し、1% (w/v) SDS / 20 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA 溶液 (pH 8.0) で溶解した。細胞破碎液を凍結乾燥させ、1× SDS sample buffer に溶解させた。細胞破碎液中の総蛋白量は BCA protein assay kit (Thermo Scientific) を用いて測定した。発現プラスミドの蛋白質発現を確認する為、等量の蛋白質を 7.5% もしくは 10% SDS-PAGE で分離した。プロット後、PVDF メンブレンを 2%スキムミルク添加した TBS-T 中で 10 分間ブロックした。Myc タグを附加した FLJ00018 は一次抗体に 1:2000 希釀した Anti-Myc モノクロナール抗体 (Roche, 0.2 µg/ml) を用い、二次抗体に 1:5000 希釀した HRP-標識モノクロナール抗マウス IgG 抗体 (MBL) を用いて検出した。リン酸化チロシン蛋白質の検出には、一次抗体に 1:2000 希釀した Anti-P-Tyr (PY20) モノクロナール抗体 (Santa Cruz Biotechnology, stock 100 µg/ml) を用い、二次抗体に 1:5000 希釀した HRP-標識モノクロナール抗マウス IgG 抗体を用いた。各種蛋白質の可視化は、enzyme-linked chemiluminescence 試薬 (GE Healthcare) を用いて LAS-4000 mini image analyzer (GE) で検出した。

5. 免疫沈降

6 cm dish に一過性にトランスフェクションされた細胞を 300 µl の細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 0.5% Nonidet P-40, phosphatase inhibitor, protease inhibitor) 中で溶解した。溶解液を 13200 rpm, 10 min 遠心後、上清の一部を分けとり、残りの上清に 1.0 µg の Anti-Myc 抗体を加え、4°Cで 2 時間ローテーシ

ヨンを行った。その後 protein G-agarose を加え、4°Cで 1 時間、ローテーションを行った。ビーズを wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 0.1% Nonidet P-40, phosphase inhibitor solution, protease inhibitor)で 3 回洗浄後、ビーズに結合した蛋白質を sample buffer 中で溶出した。一定量の免疫沈降物は 7.5% もしくは 10% SDS-PAGE で分離され、蛋白質はイムノプロット法を用いて検出した。

第3節 結果

1. FLJ00018 の cSrcCA によるチロシンリン酸化

FLJ00018 の Src によるチロシンリン酸化の有無を検討する為、HEK293 細胞に、cSrc の恒常的活性化型変異体 cSrcCA 及び、FLJ00018 を共発現させ、細胞破碎液を用いてイムノプロット解析を行った。その結果、FLJ00018 は、SrcCA と共に発現させた細胞において、チロシンリン酸化されることが明らかとなった (Fig. 2-1)。

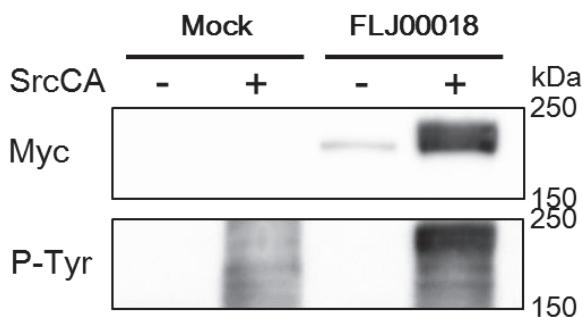


Fig. 2-1 cSrcCA による FLJ00018 のチロシンリン酸化

HEK293 細胞に Myc タグを付加した FLJ00018 及び cSrc の恒常的活性化型変異体 cSrcCA を図に示したように一過性にトランスフェクションした。細胞の破碎後、等量の蛋白質を 7.5% SDS-PAGE で分離した。イムノプロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、FLJ00018 のリン酸化チロシン残基の検出の為に、Anti-p-Tyr 抗体を用いた。

2. cSrcCA による FLJ00018 のチロシンリン酸化部位の同定

Src シグナルによりリン酸化される FLJ00018 のチロシンの位置を調べる為に、FLJ00018 のいくつかの欠損変異体と cSrcCA と共に発現させた細胞を用いてイムノプロット解析により検討した。使用した FLJ00018 の各種欠損変異体の構造は Figure 2-2A に示した。その結果、FLJ00018 WT と FLJ00018 P2 及び FLJ00018 P1.5 を cSrcCA と共に発現させた細胞では FLJ00018 のチロシンリン酸化が見られた。(Fig. 2-2B)。この結果から Src シグナルによる FLJ00018 のリン酸化チロシンの少なくとも 1 つは、FLJ00018 の 465-615 番目のアミノ酸配列内に存在する可能性が示唆された。FLJ00018 の 465-615 番目のアミノ酸配列内にあるチロシン残基は、489 番目のチロシン、510 番目のチロシンの 2 つのみである。このことから、cSrc によるリン酸化は、489 番目、510 番目のいずれか一方で起きているか、あるいはその両方が同

時にリン酸化される可能性が考えられた。そこでさらに、これらのチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した FLJ00018 Y489F, FLJ00018 Y510F 変異体を作成し、それぞれを cSrcCA と共に発現させ、チロシンリン酸化の有無を確認した。その結果、Figure 2-2C に示す様に、FLJ00018 Y510F では、チロシンリン酸化シグナルは確認できなかった。これらの結果から、cSrcCA によりリン酸化される FLJ00018 のチロシン残基は、489 番目のみであることが示唆された。

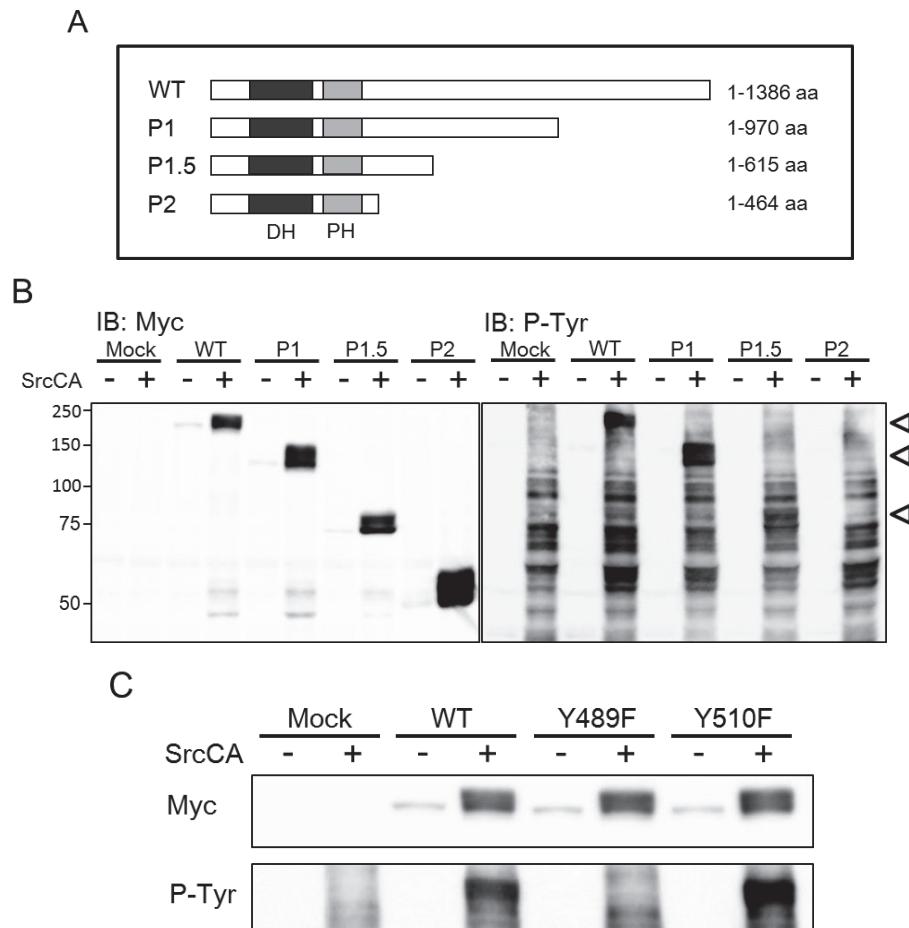


Fig. 2-2 cSrcCA による FLJ00018 のチロシンリン酸化部位の同定

A, FLJ00018 の各種変異体の構造。WT, P1, P1.5, P2 コンストラクトは、それぞれ FLJ00018 の 1-1386, 1-970, 1-615, 1-464 のアミノ酸残基が含まれる。

B, C, HEK293 細胞に Myc タグを付加した FLJ00018WT 及び各種変異体と SrcCA を図に示したように一過性にトランスフェクションした。細胞の破碎後、等量の蛋白質を 7.5% SDS-PAGE で分離した。イムノブロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、FLJ00018 のリン酸化チロシン残基の検出の為に、Anti-p-Tyr 抗体を用いた。

3. FLJ00018 の 489 番目のリン酸化チロシン残基と特異的に相互作用する生体分子の探索

一般的に、リン酸化チロシン残基は、特定の蛋白質が含有している SH2 ドメインと相互作用し、シグナル伝達などに利用されると考えられている (69,70)。現在、SH2 ドメインを持つヒト遺伝子は 121 種類にのぼり、そのファミリーは 38 に分類されている (63)。そこで、FLJ00018 の 489 番目のリン酸化チロシン残基が、どのような SH2 含有蛋白質と結合するのかを検討するため、各種蛋白質の SH2 ドメイン構造を利用した SH2 アレイアッセイを用いて検討した。FLJ00018 WT または FLJ00018 Y489F を、cSrcCA と共に発現させた細胞の細胞破碎液と、SH2 アレイ用 PVDF 膜を反応させ、一定時間後に相互作用を分析した結果、FLJ00018 と FLJ00018 Y489F との間に差異があった分子は ABL1 と PIK3R3 であった (Fig. 2-3)。ABL1 は、Src と同様に非受容体型チロシンキナーゼの一種で、PIK3R3 はイノシトールリン脂質 (PI) を特異的にリン酸化する PI-3 キナーゼの調節サブユニットの一種である。

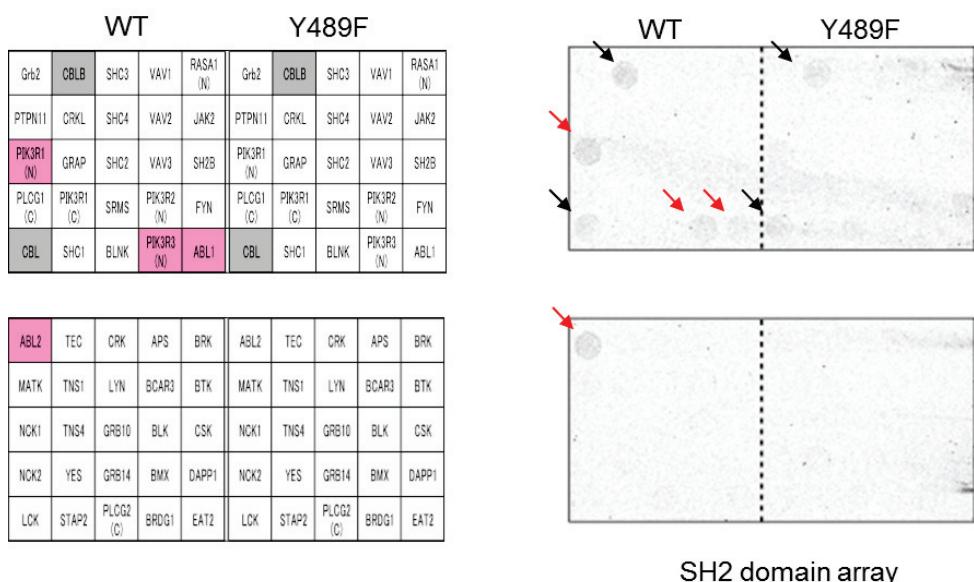


Fig. 2-3 FLJ00018 のリン酸化チロシンと相互作用する蛋白質の同定

ヒトの蛋白質に含まれる 50 種類の SH2 ドメインを Halo タグ融合蛋白質として発現させ、HaloLink アレイスライドに固定した。左の遺伝子名に含まれる (N) 及び (C) は、タンデムな 2 つの SH2 ドメインの内、それぞれ N 末端側、C 末端側の SH2 ドメインであることを示している。右の図に示す、黒の矢印は、WT, Y489F どちらにも結合した SH2 ドメインを、赤の矢印は、WT のみに結合した SH2 ドメインを示す。

4. FLJ00018 と ABL1 および PIK3R3 との相互作用

ABL1 と PIK3R3 が細胞内で FLJ00018 のリン酸化チロシンを介して相互作用するかどうかについて、ABL1 WT および、PIK3R3 WT を発現するプラスミドを作成し、免疫沈降法を用いて検討した。cSrcCA と FLJ00018 WT または Y489F と、ABL1 を共発現させた細胞では、FLJ00018 WT と FLJ00018 Y489F はどちらも等しく ABL1 と結合することが示唆された (Fig. 2-4A)。一方、FLJ00018 Y489F と共に沈降する PIK3R3 の量は、FLJ00018 WT と共に沈降する PIK3R3 に比べ弱かった (Fig. 2-4B)。これらの結果から、PI3KR3 は FLJ00018 の 489 番目のリン酸化チロシン残基と特異的に相互作用することが示唆された。しかしながら、ABL1 は SH2 ドメインと FLJ00018 の 489 番目のリン酸化チロシン残基の相互作用に加え、SH2 ドメイン以外の部位を介した FLJ00018 との相互作用も示唆された。

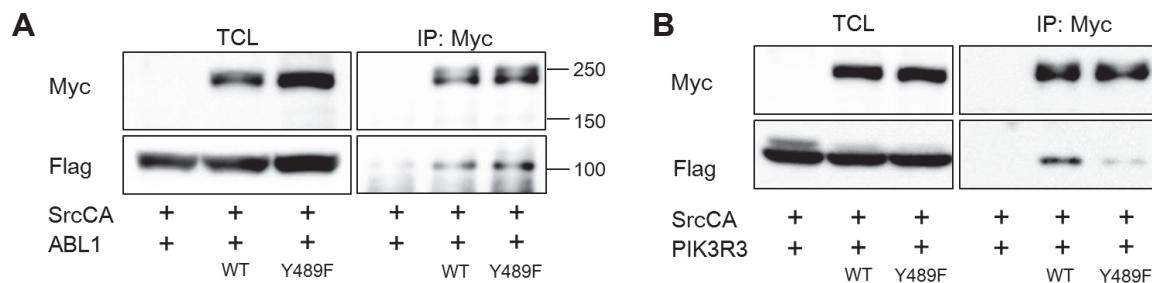


Fig. 2-4 PIK3R3 及び ABL1 と FLJ00018 の相互作用

A, B, HEK293 細胞に Src、Myc タグを付加した FLJ00018WT および Y489F、Flag-タグを付加した ABL1 及び PIK3R3 を図に示したように一過性にトランスフェクションした。細胞の破碎後、抗 Myc 抗体を用いて FLJ00018 を免疫沈降した。免疫沈降後、7.5% SDS-PAGE で分離した。イムノブロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、Flag タグが付加された ABL1、PIK3R3 の検出の為に、Anti-Flag 抗体を用いた。

5. ABL1 及び cSrcCA による FLJ00018 のチロシンリン酸化とシグナル伝達経路

ABL1 も Src と同様に非受容体型チロシンキナーゼである。そこで、ABL1 による FLJ00018 のチロシンリン酸化および、チロシンリン酸化に関わるアミノ酸残基について検討した。その結果、FLJ00018 は、ABL1 によってもチロシンリン酸化され、そのリン酸化部位は Src と同様に、489 番目のチロシン残基のみで生じることが明らかとなった (Fig. 2-5A)。ABL1 は、Src ファミリーチロシンキナーゼ経路を介して活性化されるという報告がある (71,72)。そこで、Src 特異的阻害剤 PP2 及び、ABL1 特異的阻害剤 GNF-2 を用いて検討を行った。Figure 2-5B に示す様

に、ABL1 と FLJ00018 を共発現させた細胞に、GNF-2 を作用させた場合、FLJ00018 のチロシンリン酸化が阻害されたが、cSrcCA と FLJ00018 を共発現させた細胞に GNF-2 を作用させた場合、FLJ00018 のリン酸化は阻害されなかった。一方、FLJ00018 と cSrcCA を共発現させた細胞に PP2 を作用させた場合には、リン酸化が完全に抑えられたが、ABL1 と FLJ00018 を共発現させた細胞に PP2 处理を行っても、FLJ00018 のチロシンリン酸化は阻害されなかった (Fig. 2-5C)。これらの結果から、ABL1 と Src はそれぞれ別のシグナル経路を介して、FLJ00018 のリン酸を引き起こす可能性が示唆された。

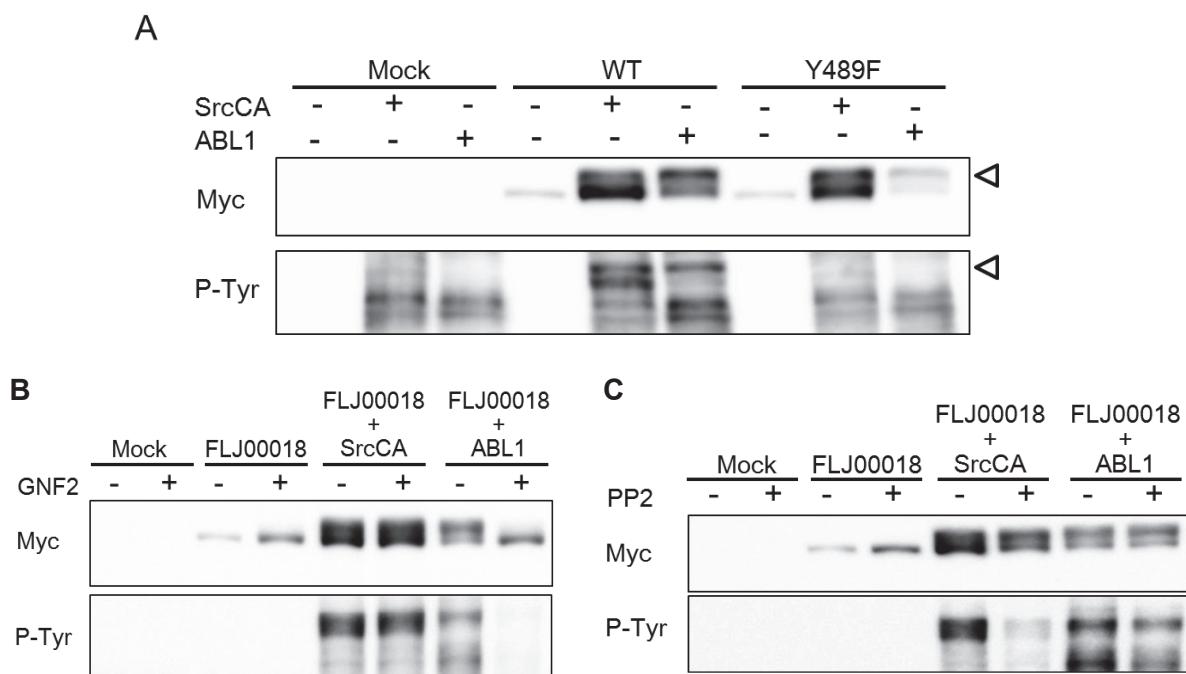


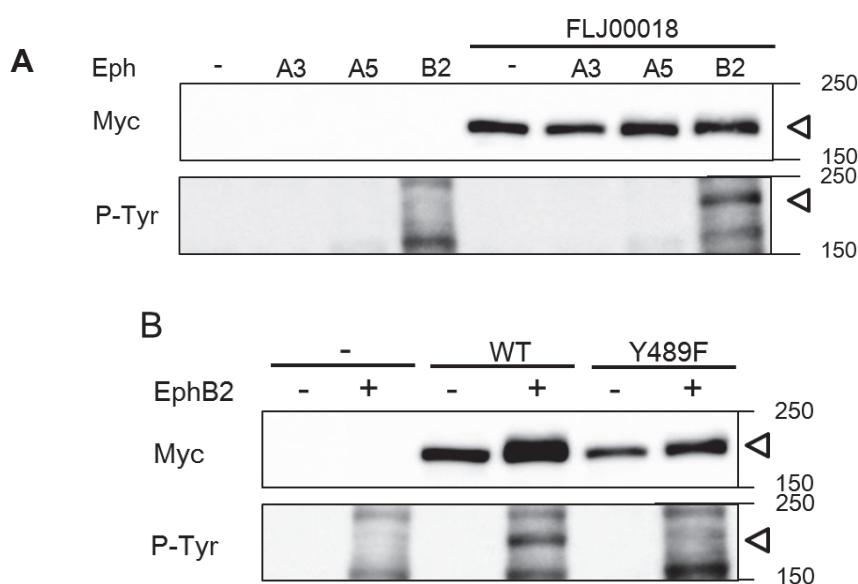
Fig. 2-5 cSrcCA、ABL1によるFLJ00018のチロシンリン酸化

A, B, C, HEK293 細胞に Myc タグを付加した FLJ00018WT 及び Y489F 各種変異体と cSrcCA または ABL1 を図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション後、血清飢餓処理と同時に GNF2 (10 μM, B) もしくは PP2 (10 μM, C) 处理を行い、16 時間培養した。細胞の破碎後、等量の蛋白質を 7.5% SDS-PAGE で分離した。イムノプロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、FLJ00018 のリン酸化チロシン残基の検出の為に、Anti-p-Tyr 抗体を用いた。

6. EphB2/Src シグナル経路による FLJ00018 のチロシンリン酸化

Asef や Cool-1 を含むいくつかの RhoGEF が、EGFR の下流において、チロシンリン酸化されるという報告がある (28,51)。しかしながら FLJ00018 は、第 1 章で述べたように、EGFR

の下流において、チロシンリン酸化は受けなかった。一方、Src ファミリーキナーゼの活性化に、エフリン受容体 (Eph) が関与するという報告がある。そこで、Eph の下流において FLJ00018 がチロシンリン酸化されるかについて検討を行った。各種 Eph と FLJ00018 を HEK293 細胞に共発現させ、FLJ00018 のチロシンリン酸化の有無を調べたところ、Figure 2-6A に示す様に、EphB2 と FLJ00018 を共発現させた場合においてのみ、FLJ00018 のチロシンリン酸化が見られた。次に、EphB2 の下流において、Src を介して FLJ00018 がリン酸化されるかどうかを検討する為、まず、FLJ00018 Y489F を EphB2 と共に発現させ、検討を行った。その結果、FLJ00018 Y489F は、EphB2 を介したチロシンリン酸をうけなかった (Fig. 2-6B)。これらの結果から、FLJ00018 は、EphB2 シグナルを介して、チロシンリン酸化され、そのリン酸化部位は、Src や ABL1 と同様に 489 番目のチロシン残基で生じていることが示唆された。そこで次に、EphB2 による FLJ00018 のチロシンリン酸化に、Src や ABL1 が関与するかどうかについて、PP2 及び、GNF-2 を用いて検討を行った。FLJ00018 及び、EphB2 を共発現させた細胞に、ABL1 特異的阻害剤 GNF2 処理を行ったところ、EphB2 による FLJ00018 のチロシンリン酸化の阻害は見られなかった (Fig. 2-6C)。一方、同様の条件の細胞に、Src 特異的阻害剤 PP2 処理を行ったところ、EphB2 による FLJ00018 のチロシンリン酸化が阻害された (Fig. 2-6D)。以上の結果より、EphB2 シグナルによる FLJ00018 の 489 番目のチロシンのリン酸化は、Src によって仲介されることが示唆された。



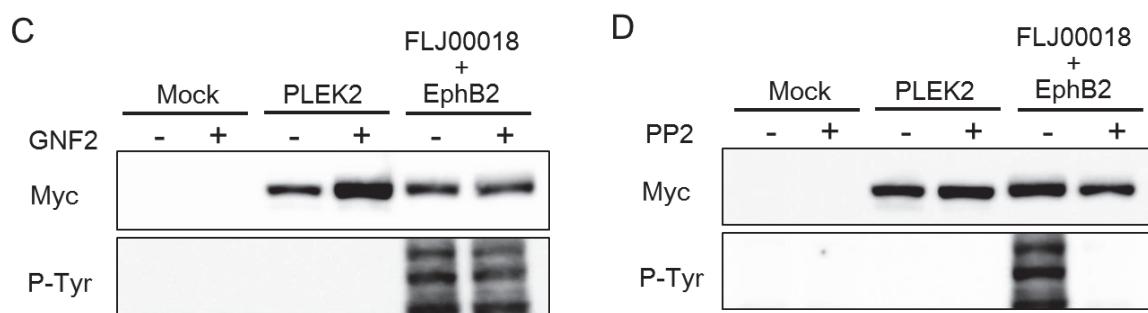


Fig. 2-6 EphB2/cSrc シグナルを介した FLJ00018 のチロシンリン酸化

A, HEK293 細胞に Myc タグを付加した FLJ00018 WT と各種 Eph を図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション後、細胞を破碎し、等量の蛋白質を 7.5% SDS-PAGE で分離した。イムノプロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、FLJ00018 のリン酸化チロシン残基の検出の為に、Anti-p-Tyr 抗体を用いた。

B, C, D, HEK293 細胞に Myc タグを付加した FLJ00018 WT 及び Y489F 各種変異体と EphB2 を図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション後、血清飢餓処理と同時に GNF2 (10 μM, C) もしくは PP2 (10 μM, D) 処理を行い、16 時間培養した。細胞の破碎後、等量の蛋白質を 7.5% SDS-PAGE で分離した。イムノプロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、FLJ00018 のリン酸化チロシン残基の検出の為に、Anti-p-Tyr 抗体を用いた。

第4節 考察

本研究では、HEK293 細胞において、FLJ00018 が EphB2/Src シグナル経路によってリン酸化され、そのリン酸化部位は、489 番目のチロシン残基であることを明らかにした (Fig. 2-2)。一般的に、リン酸化チロシン残基は、種々の蛋白質がもつ SH2 ドメインによって認識され、その結合を介した蛋白質間の相互作用に関わっていると考えられている。そこで、本研究では、SH2 ドメインアレイを行い、FLJ00018 のリン酸化特異的相互作用分子として、ABL1 及び、PIK3R3 を見出した (Fig. 2-3)。しかしながら、培養細胞内では、どちらの蛋白質も、FLJ00018 との相互作用は見られるものの、PIK3R3 のみがチロシンリン酸化依存的な結合をすることが示唆された (Fig. 2-4)。

過去、RhoGEF の Src によるチロシンリン酸化についていくつかの報告がある。Asef は EGF の下流で活性化された Src ファミリーキナーゼによって、94 番目のチロシンがリン酸化されることが報告されている (28)。また、別の RhoGEF である Vav1 や Cool-1 も Src ファミリーキナーゼによってリン酸化されることが報告されている (51,73)。更に、RacGEF である Tiam1 も、Src によって 389 番目のチロシンがリン酸化されることが示されている (67)。一方、Vav は、BCR-ABL によってチロシンリン酸化される (74)。BCR-ABL は、ABL の遺伝子を有する 9 番染色体と BCR の遺伝子を有する 22 番染色体の転座により生じるフィラデルフィア染色体からできる遺伝子産物である。Ras-GEF である Sos-1 は、RTK の下流において活性化された ABL によりリン酸化され、Rac に対する GEF としても働くということが示されている (75)。これらの結果は、RhoGEF の 1 種である FLJ00018 も Src や ABL によってリン酸化されるという結果を支持する。

ABL1 は、PDGF 受容体刺激や Src ファミリーチロシンキナーゼを介して活性化されるという報告がある (71,72)。一方、Src が β_2 AR 刺激により遊離した $G\beta\gamma$ によって活性化され、活性化された Src によって PDGF 受容体及び PIK3 が働くという報告もある。また、EphB2 の 611 番目のチロシンのリン酸化によって、EphB2 と Src が相互作用するという報告もある (76)。本研究では、各種阻害剤を用いた検討の結果から、Src と ABL はそれぞれ独立した経路を介して FLJ00018 のチロシンリン酸化を引き起こすことが示唆された。また、Src による FLJ00018

のチロシンリン酸化経路として、EphB2 による Src の活性化経路が関与していることが示唆された。さらに、前章でも述べたように、PDGFR と同様な膜一回貫通型の受容体型チロシンキナーゼの一種である EGFR のシグナルを介した FLJ00018 のチロシンリン酸化は見られなかった。このことからも、EphB2/cSrc による FLJ00018 のリン酸化と ABL による FLJ00018 のリン酸化の経路は独立して働くことがより確からしいと考えられた。

本研究では ABL がどのような細胞外刺激を介して FLJ00018 をリン酸化するか、また、FLJ00018 の EphB2/Src シグナルによる FLJ00018 のリン酸化の生体内における意義、及び PIK3R3 との相互作用が果たす生理的役割は明らかにできなかった。しかしながら、EphB2 や Src は細胞増殖やがん細胞の増殖と密接にかかわっていることが示唆されており、PIK3R3 との相互作用や、FLJ00018 のリン酸化による活性変化及び細胞形態変化を検討することにより、がんの病態解明に貢献できる可能性があると考えられた。

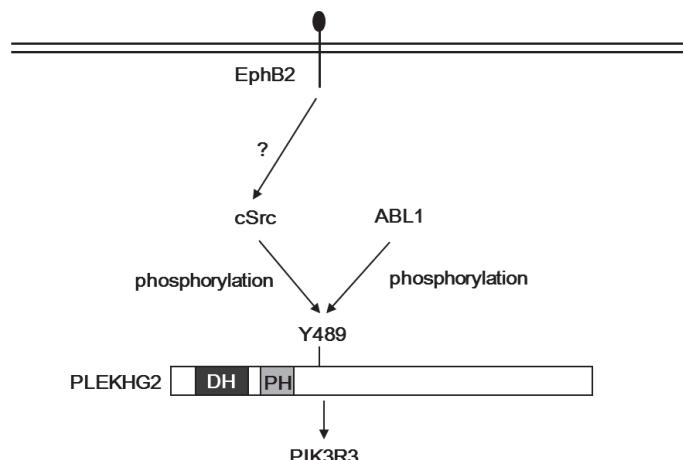


Fig. 2-7 EphB2/Src シグナルによる FLJ00018 のチロシンリン酸化と ABL1 による FLJ00018 のリン酸化 EphB2が活性化された後、cSrc を介して FLJ00018 の 489 番目のチロシン残基がリン酸化される。このリン酸化部位は、ABL1 によるリン酸化部位と同様であるが、ABL1 の活性化経路は不明である。FLJ00018 のリン酸化チロシン残基は、PIK3R3 の SH2 ドメインと特異的に相互作用する。

第3章 FLJ00018と非筋細胞アクチンの相互作用と活性調節

第1節 緒言

第1章および第2章において、FLJ00018のリン酸化による活性調節機構に着目し、FLJ00018のEGF刺激による活性調節とスレオニンリン酸化及び、EphB2/Src経路によるチロシンリン酸化を介したシグナル分子との相互作用について明らかにした。

FLJ00018のチロシンリン酸化依存的な蛋白質相互作用と類似して、他のRhoGEFの一種のVav1もその構造中に複数のチロシンリン酸化部位を有している。また、Vav1のそれぞれのリン酸化チロシン残基に対し、特異的に結合する蛋白質の網羅的解析がされており、機能変化についても解析がされている(77)。

一方で、他のRhoGEFであるPDZ-RhoGEF、LARG、p115RhoGEFは、多くのGEFに特徴的なDHドメイン、PHドメインの他に、N末端付近にRGSドメインを有している。また、PDZ-RhoGEFやLARGは、RGSよりさらにN末端側の配列にPDZドメインを有している。前章までに述べたように、GPCR刺激により活性化された三量体G蛋白質の $G\alpha_{12/13}$ サブユニットは、p115-RhoGEFを含むこれらのRhoGEFのRGSドメインと直接相互作用することにより活性化され、細胞形態変化に重要なアクチン細胞骨格制御や遺伝子発現調節を行うことが知られている(14,15)。このように、GPCR刺激により活性化される一方で、LARGやPDZ-RhoGEFはPDZドメインを介し、GPCRとは異なる種類の細胞膜受容体であるPlexin B1受容体の細胞質ドメインと相互作用することによっても活性化を受けることが報告されている(78-82)。

この様に、リン酸化の有無にかかわらず、他の蛋白質との相互作用は、蛋白質の機能発現や細胞局在変化に重要な変化を与えると考えられる。FLJ00018は、1386アミノ酸もの多くのアミノ酸を有する巨大蛋白質であるので、FLJ00018が、GEF活性に加え、他の蛋白質の足場として働く可能性や、他の蛋白質との相互作用によって、FLJ00018の局在が変化する可能性も考えられる。そこで、本章では、FLJ00018のアミノ酸をDH、PHを含む、1-465番目のアミノ酸を含む領域、466-965番目のアミノ酸を含む領域、及び966-1386番目のアミノ酸を含む領域の3つに分け、それぞれの領域と相互作用する蛋白質を酵母two-hybrid法を用いて網羅的解析を行

った。検討を行った FLJ00018 の 3 つの領域の内、DH, PH を含む N 末端側の 1-465 番目の配列以外は、蛋白質相互作用を介することなく、その配列のみにおいて、レポーター遺伝子の発現が生じ、栄養要求培地における自立生存能を示したことから、酵母 two-hybrid による解析を行うことができなかった。本章では、スクリーニングを行うことのできた、FLJ00018 の 1-465 番目のアミノ酸と相互作用する蛋白質の内の 1 つである非筋細胞アクチンについて示す。

第2節 実験材料および方法

1. プラスミドと試薬

pEGFP- β -actin は Clontech から入手した。 β -actin 及び、 γ -actin の cDNA は、PCR 法、及び制限酵素処理を用いて、pF5A-CMV-neo ベクターに組み込まれた。FLJ00018 の各種欠損変異体は、pFN21A-Myc-FLJ00018 WT を鋳型とし、PCR 法 (Stratagene) 及び、制限酵素を用いて作製した。pSRE.L-luciferase reporter は、Stratagene から、pRL-SV40 は、Nippon Gene から購入した。pF5A-CMV-neo-G β_1 及び、pF5A-CMV-neo-G γ_2 は第 1 章で述べたプラスミドと同一である。pCDNA3.1-Rac1 は、Missouri S&T cDNA Resource Center から入手した。ヌクレオチドフリー変異体である RacG15A は、PCR 及び、制限酵素処理によって作成され、pGEX-4T1 ベクターに組み込まれた。phosphatase 阻害剤、protease 阻害剤は Roche から入手した。ウサギ抗 PLEKHG2 抗体は、Bethyl Laboratories から購入した。マウス抗 Flag 抗体、マウス抗 Myc 抗体は Wako から購入した。HRP 共役した抗 GST 抗体は、GE から購入した。

2. 酵母 two-hybrid スクリーニング

酵母 two-hybrid スクリーニングには、Matchmaker Gold two-hybrid システム (Clontech) を利用した。bait には、FLJ00018 の 1-465 アミノ酸をコードする遺伝子配列を利用し、転写因子 Gal4 DNA 結合ドメインとの融合遺伝子として pGBKT7-ベクターに組み込まれた。この bait プラスミド、pGBKT7-FLJ00018 1-465 は、酵母 Y187 株に導入した。prey には、pGADT7 ベクターに組み込まれたヒト胎児脳 cDNA-Gal4 DNA 転写活性化ドメイン融合遺伝子のライブラリーを利用した (Clontech)。このライブラリーは酵母 Y2H Gold 株に導入された。Y187 株と Y2H Gold 株を接合後、陽性クローニングをロイシン、トリプトファンを除いた SD 培地上でスクリーニングした。得られた陽性クローニングはさらに、アデニン、ヒスチジン、トリプトファン、ロイシンの 4 アミノ酸を除いた SD 培地上でスクリーニングされた。このスクリーニングで得られた陽性クローニングからプラスミドを取得、配列確認を行った後、えられたプラスミドを pGBKT7-FLJ00018 1-465 と Y2H Gold 株にコトランスマスクームすることにより、真の陽性クローニングを得た。

3. 細胞培養とトランスフェクション

HEK293 細胞は、37°C, 5% CO₂ 加湿大気圧下で、10% FBS を添加した DMEM で培養した。 NIH3T3 細胞は、37°C, 5% CO₂ 加湿大気圧下で、10% CS を添加した DMEM で培養した。一過性のトランスフェクションは LipofetAMINE 及び、Lipofectamine2000 試薬を用いて製品の使用法に従って行った (Life Technologies)。SRE 依存的遺伝子転写活性測定には 0.4 μg の DNA を、イムノプロット解析には 1 μg の DNA を、免疫沈降法および pull-down アッセイには 2 μg の DNA を用いた。トランスフェクション後、細胞を 37°C で 6-8 時間培養し、その後、細胞を無血清培地に置き換え、16-18 時間培養した。

4. Serum response element 依存的転写活性 (SRE 活性) 測定

24 穴プレートに播かれた細胞に各種発現プラスミドとともに pRL-SV40 コントロールレポータープラスミド、pSRE.L-luciferase プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクション後、細胞を氷冷 PBS で 1 回洗浄後、細胞溶解液を用いて細胞を溶解した。細胞溶解液を 13200 rpm, 10 min で遠心後、上清を分離した。ルシフェラーゼ活性測定は dual luciferase reporter assay system (Promega) を用いて、製品の使用方法に従って行った。レポーター活性はコントロールベクターの活性に対して標準化し、データは実験の平均値±S.D. を示した。

5. 免疫沈降

6 cm dish に一過性にトランスフェクションされた細胞を 300 μl の細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 0.5% Nonidet P-40, phosphase inhibitor, protease inhibitor) 中で溶解した。溶解液を 13200 rpm, 10 min で遠心後、上清の一部を分けとり、残りの上清に 1.0 μg の Anti-Myc 抗体を加え、4°C で 2 時間ローテーションを行った。その後 protein G-agarose を加え、4°C で 1 時間、ローテーションを行った。ビーズを wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 0.1% Nonidet P-40, phosphase inhibitor solution, protease inhibitor) で 3 回洗浄後、ビーズに

結合した蛋白質を sample buffer 中で溶出した。一定量の免疫沈降物は 7.5% もしくは 10% SDS-PAGE で分離され、蛋白質はイムノプロット法を用いて検出した。

6. Pull-down アッセイ

FLJ00018 の活性化のレベルは、大腸菌 DH5 α 株で培養し、精製された GST-Rac G15A を用いて評価した (83)。6 cm dish に一過性にトランスフェクションされた HEK293 細胞を 300 μ l の細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 0.5% Nonidet P-40, 10% Glycerol, phosphase inhibitor, protease inhibitor) 中で溶解した。溶解液を 13200 rpm, 10 min で遠心後、上清の一部を分けとり、残りの上清にグルタチオンセファロース 4B ビーズが融合した GST-Rac G15A を加え、4°C で 1 時間ローテーションを行った。その後ビーズを wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 0.1% Nonidet P-40, 10% Glycerol, phosphase inhibitor solution, protease inhibitor) で 3 回洗浄後、ビーズに結合した蛋白質を sample buffer 中で溶出した。一定量の免疫沈降物は 7.5% もしくは 10% SDS-PAGE で分離され、蛋白質はイムノプロット法を用いて検出した。

7. 細胞免疫染色と細胞形態の観察

カバーガラス上で一過性に強制発現させた細胞を氷冷 PBS で一回洗浄後、30 分間、4% パラホルムアルデヒド固定させた。固定した細胞に 0.1% Triton-X 処理を行い、PBS で 4 回洗浄後、10% goat serum で 1 時間ブロッキングした。その後、各図に示した一次抗体で 1 時間ラベルし、さらに、抗マウス IgG-Alexa-Flour488 及び Alexa-Flour568 Phalloidin で染色した。染色したカバーガラスは、Perma Fluor で処理させ、蛍光イメージを蛍光顕微鏡により観察した (BZ-9000; KEYENCE)。

第3節 結果

1. FLJ00018 相互作用分子としての非筋細胞アクチンの同定

FLJ00018 の新規結合蛋白質を同定する為、FLJ00018 の GEF 活性に重要な DH 及び PH ドメインを含む 1-465 番目のアミノ酸配列を用い、酵母 two-hybrid 法を行った。bait として用いた FLJ00018 1-465 アミノ酸を導入した酵母 Y187 株と、ヒト胎児脳 cDNA から得られた FLJ00018 結合候補蛋白質の発現ベクターのライブラリーを導入した酵母 Y2H Gold 株を接合させた。接合した 9.0×10^6 クローンの酵母をトリプトファン及びロイシンを欠く SD 培地上で培養し、スクリーニングをおこなったところ、1424 個の陽性クローンが得られた。これらすべてをさらに選択性の高い、アデニン、ヒスチジン、トリプトファン、ロイシンを欠く SD 培地上で培養を行ったところ、971 の陽性クローンを得た。得られたクローンから 285 個を無作為に選択し遺伝子抽出を行い、FLJ00018 1-465 の配列と共に再び Y2H Gold 株にトランスフォームすることで、候補遺伝子の自立活性化能の有無の確認を行った。これらのスクリーニングによって得られた真の陽性クローン 121 個の配列確認を行った。

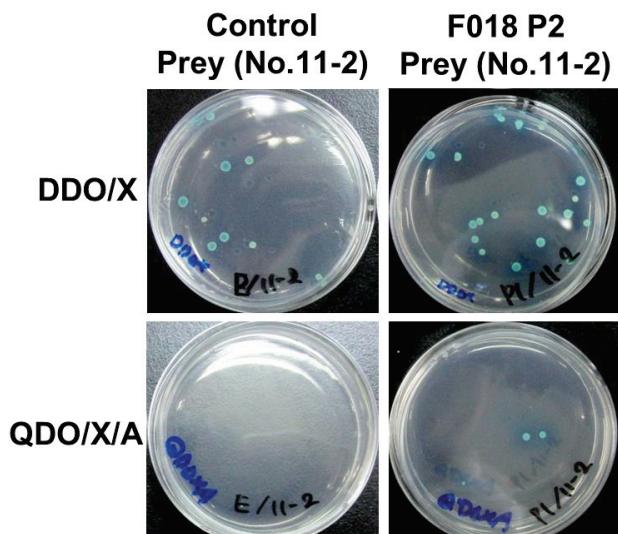


Fig. 3-1 FLJ00018 1-465aa (Bait) とクローン 11-2 (Prey) の相互作用
pGBK7-FLJ00018 1-465aa または、pGBK7-DNA-BD を pGADT7-11-2 とともに酵母 Y2H Gold 株にトランスフォームし平板培地で培養した。上段(DDO/X); トリプトファン、ロイシンを除いた SD 培地、下段(QDO/X/A); トリプトファン、ロイシン、アデニン、ヒスチジンを除いた SD 培地。

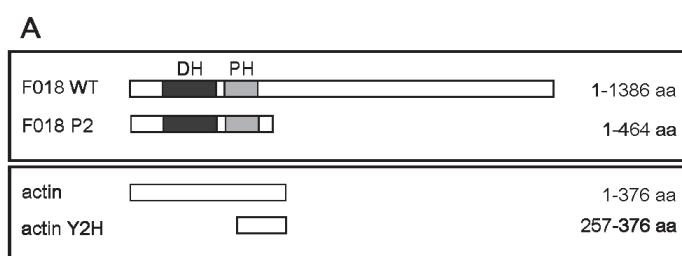
Figure 3-1 に、クローン番号 11-2 の自立活性化能を試験した結果を示す。左下の写真に示すように、コントロールベクターと 11-2 を形質転換した酵母は選択培地に生存できず、右下の写真に示すように、bait と 11-2 の形質転換は存在できることから、陽性であることが確認できる。

この遺伝子の配列を GenBank のデータベース上の配列と比較したところ、非筋細胞において発現する γ -アクチンと高い相同意を有することが明らかとなった。

2. 培養細胞内における FLJ00018 と γ -アクチン及び β -アクチンとの相互作用

脊椎動物におけるアクチンは、6つのアイソフォームが存在し、横紋筋、骨格筋及び、非筋細胞の細胞質で発現するアイソフォームがそれぞれ 2つずつ存在することが知られている。それぞれのアイソフォームは高い相同意を示し、特に、非筋細胞の細胞質で発現するアイソフォームである γ -アクチンと β -アクチンは N 末端の 1, 2, 3 そして 9 番目のアミノ酸を除く配列は等しい(84)。今回 two-hybrid で得られた配列は γ -アクチンの 257-376 番目のアミノ酸と高い相同意を示し、 γ -アクチンの 257-376 番目の配列は、 β -アクチンとも相同意を有する (Fig. 3-2A)。そこで、Flag-タグを付加した γ -アクチン及び、 β -アクチンを作成し、Myc タグを付加した FLJ00018 と共に HEK293 細胞に共発現させ、免疫沈降を行うことにより、培養細胞内における相互作用を確認した。その結果、Figure 3-2B に示す様に、FLJ00018 WT と共に沈降する γ -アクチン及び、 β -アクチンが見られ、FLJ00018 は哺乳類細胞においても γ -アクチン及び、 β -アクチンと相互作用することが示唆された。また、酵母 two-hybrid 法で用いた FLJ00018 の 1-465 番目のアミノ酸配列についても同様に γ -アクチン及び、 β -アクチンと相互作用することが明らかとなった (Fig. 3-2C)。

さらに、内因性の β -アクチンとの相互作用を検討するため、FLJ00018 を単独で細胞に発現させ免疫沈降物を解析した結果、FLJ00018 WT 及び FLJ00018 P2 との共沈降物内に β -アクチンのシグナルが確認され、生理的条件下でも FLJ00018 が β -アクチンと相互作用することが示唆された (Fig. 3-2D)。



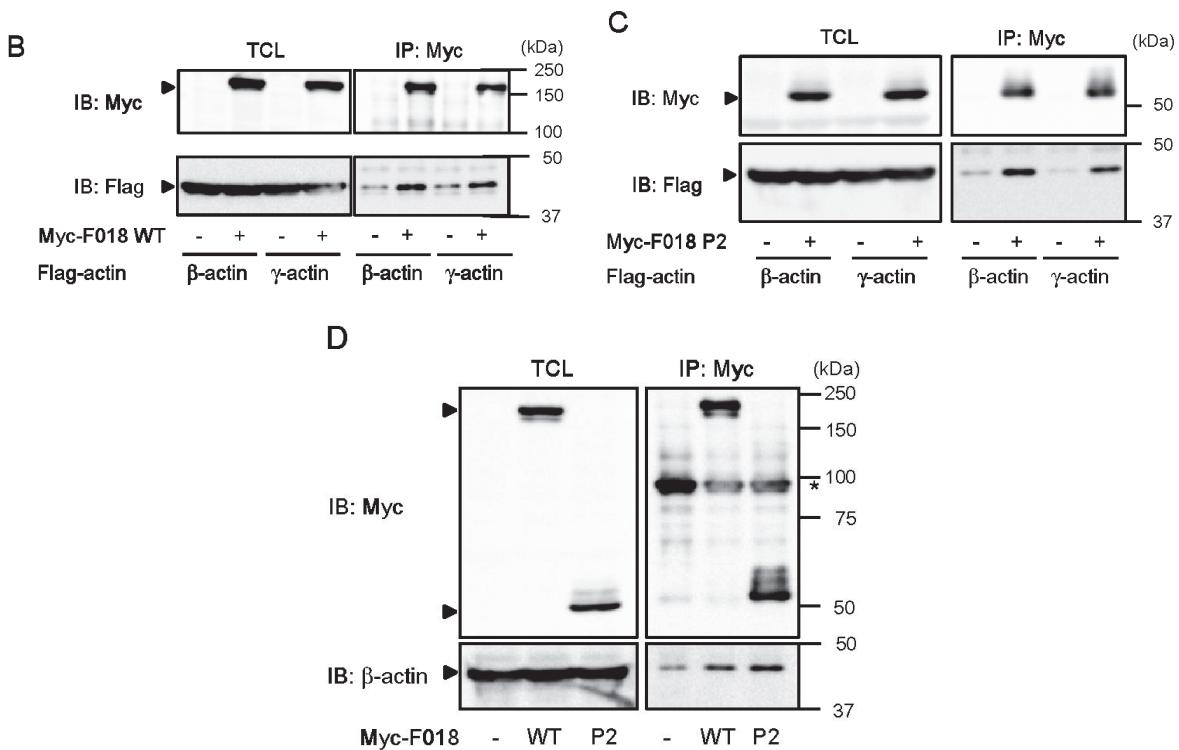


Fig. 3-2 FLJ00018 と非筋細胞アクチンとの相互作用

A, FLJ00018 及び非筋細胞アクチンの構造。DH, dbl ホモロジードメイン; PH, pleckstrin ホモロジードメイン; Y2H, yeast two-hybrid prey コンストラクト
 B-C, HEK293 細胞に Myc タグを付加した FLJ00018 WT (B) 又は、FLJ00018 P2 (C) を、Flag-タグを付加した β -アクチン及び γ -アクチンと共に図に示したように一過性にトランスフェクションした。細胞の破碎後、抗 Myc 抗体を用いて FLJ00018 を免疫沈降した。免疫沈降後、SDS-PAGE で分離した。イムノプロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、Flag タグが付加されたアクチンの検出の為に、Anti-Flag 抗体を用いた。
 D, HEK293 細胞に Myc タグを付加した FLJ00018WT 又は、FLJ00018 P2 を図に示したように一過性にトランスフェクションした。細胞の破碎後、抗 Myc 抗体を用いて FLJ00018 を免疫沈降した。免疫沈降後、SDS-PAGE で分離した。イムノプロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、アクチンの検出の為に、Anti- β -アクチン抗体を用いた。(*)は、免疫沈降時に加えた Myc-抗体に由来する非特異的な結合を示す。

3. β -アクチンとの相互作用に関わる FLJ00018 上の配列の同定

FLJ00018 が、two-hybrid で用いた、1-465 アミノ酸の領域以外において相互作用するかを検討する為、FLJ00018 の 449-1386 番目のアミノ酸配列をコードする FLJ00018 Δ NT 変異体を作成し (Fig 3-3A)、免疫沈降法を用いて β -アクチンとの相互作用を解析した。Figure 3-3B に示す様に、FLJ00018 Δ NT は、 β -アクチンと共に沈降し、1-465 番目のアミノ酸配列以外にも

FLJ00018 とアクチンとの相互作用する配列があることが示唆された。これらの結果から、FLJ00018 とアクチンとの相互作用配列は、少なくとも 2箇所存在することが示唆された。

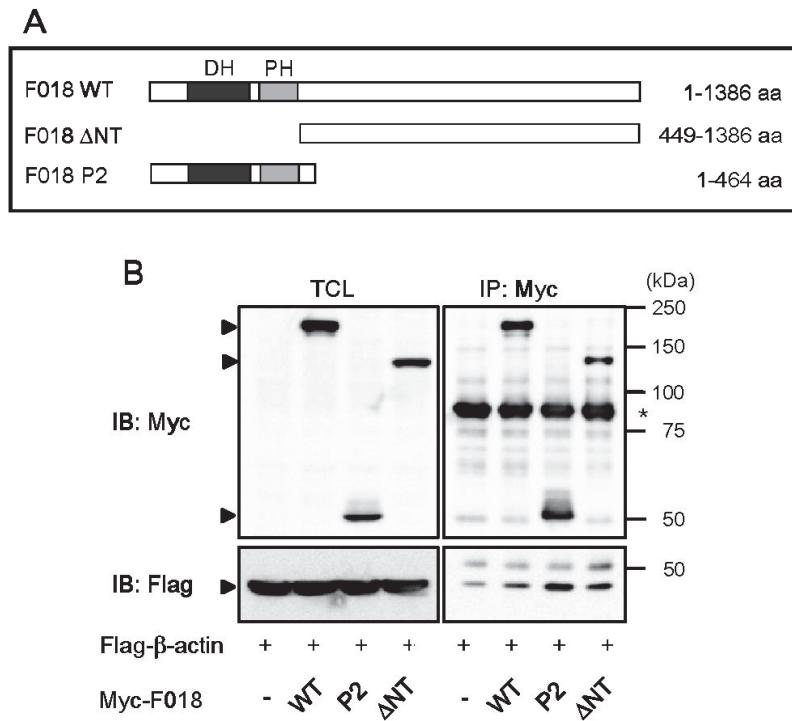


Fig. 3-3 FLJ00018 ΔNT 変異体と非筋細胞アクチンとの相互作用

A, FLJ00018 ΔNT 変異体の構造。FLJ00018 ΔNT は FLJ00018 の 449-1386 番目までのアミノ酸をコードする。

B, HEK293 細胞に Myc タグを付加した FLJ00018 WT または、FLJ00018 P2, FLJ00018 ΔNT を、Flag-タグを付加した β -アクチンと一緒に過性にトランスフェクションした。細胞の破碎後、抗 Myc 抗体を用いて FLJ00018 を免疫沈降した。免疫沈降後、SDS-PAGE で分離した。イムノプロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、Flag タグが付加されたアクチンの検出の為に、Anti-Flag 抗体を用いた。(*)は、免疫沈降時に加えた Myc-抗体に由来する非特異な結合を示す。

FLJ00018 の 1-465 番目の領域における相互作用部位の詳細についてさらに解析を進める為、1-465aa の N 末端及び C 末端から順に欠損させた変異体を作成した (Fig. 3-4A)。作製した FLJ00018 の各種変異体のうち、まず P2 (Bait) と各種 N 末端欠損変異体である P2 ΔN1 変異体、P2 ΔN2 変異体、P2 ΔN3 変異体と β -アクチンの相互作用について検討を行った。その結果、Bait と同様の配列をもつ F018 P2 の他に、P2 ΔN1 及び P2 ΔN2 では β -アクチンとの相互作用が見られたが、P2 ΔN3 では β -アクチンとの相互作用は見られなかった (Fig. 3-4B)。次に、bait として使用した P2 変異体内の C 末端側を欠損させた P2 ΔC1, P2 ΔC2, P2 ΔC3 及び PH 変異体

と β -アクチンとの相互作用について検討を行った。その結果、P2 Δ C1, P2 Δ C2 及び、P2 Δ C3 では β -アクチンとの相互作用が確認できたが、PH では相互作用が確認できなかった (Fig. 3-4C)。以上の結果より、FLJ00018 P2 内では FLJ00018 の活性に重要な DH ドメインを含む 150 番目から 283 番目のアミノ酸配列が、 β -Actin との相互作用に必要な配列であることが示唆された。

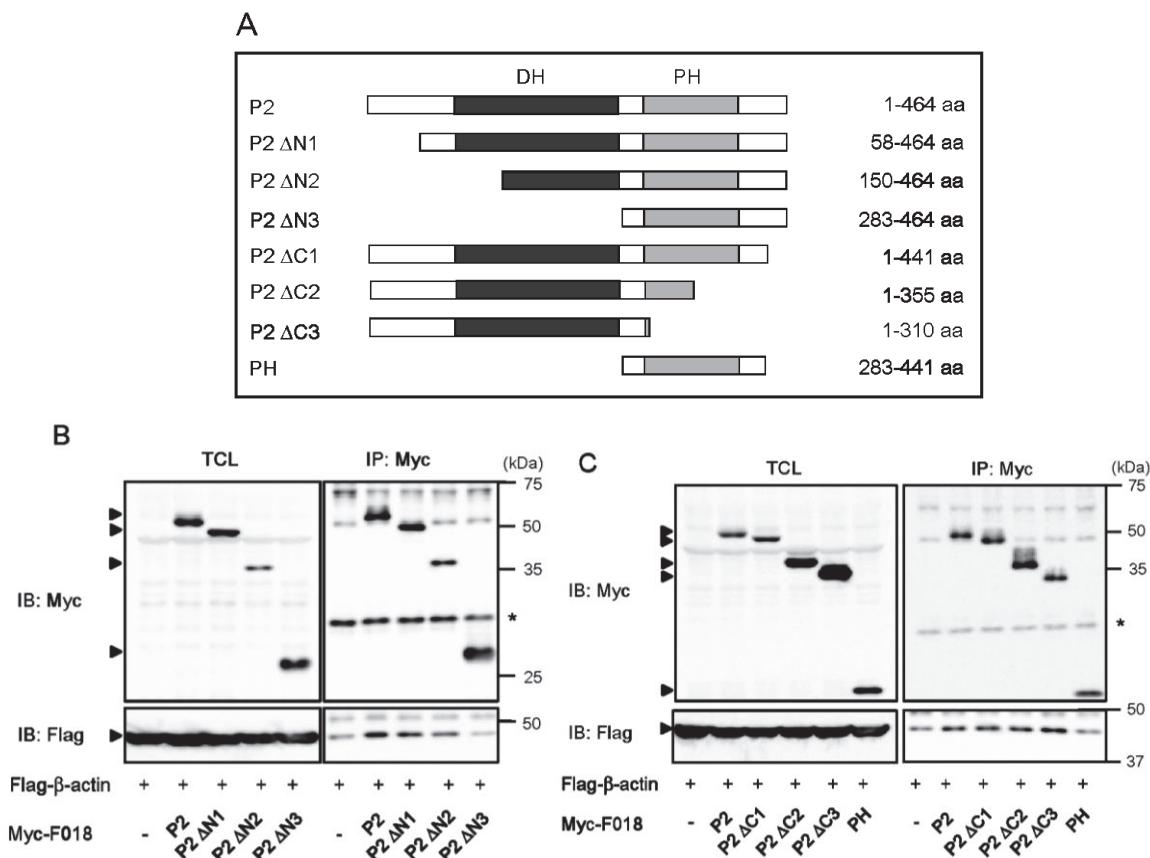


Fig. 3-4 FLJ00018 P2 領域における非筋細胞アクチンとの相互作用領域の同定

A, FLJ00018 P2 の各種変異体の構造。P2, P2 Δ N1, P2 Δ N2, P2 Δ N3, P2 Δ C1, P2 Δ C2, P2 Δ C3, PH はそれぞれ FLJ00018 の 1-464, 58-464, 150-464, 283-464, 1-441, 1-355, 1-310 そして 283-441 番目までのアミノ酸をコードしている。

B, C, Myc タグを付加した FLJ00018 の各種変異体と Flag-タグを付加した β -アクチンを HEK293 細胞内に一過性にトランスフェクションした。細胞の破碎後、抗 Myc 抗体を用いて FLJ00018 を免疫沈降した。免疫沈降後、SDS-PAGE で分離した。イムノブロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、Flag タグが付加されたアクチンの検出の為に、Anti-Flag 抗体を用いた。(*)は、免疫沈降時に加えた Myc 抗体に由来する非特異な結合を示す。

4. β -アクチンおよび γ -アクチンによる FLJ00018 を介した SRE 依存的転写活性の抑制

FLJ00018 とアクチンとの相互作用が FLJ00018 の活性にどのような影響を与えるのかについて調べるために、 β -アクチンおよび、 γ -アクチンを、FLJ00018 WT および、P2 とそれぞれ共

発現させ FLJ00018 活性化の指標である SRE 活性測定を行なった。

その結果、それぞれの蛋白質の発現に差異が見られないにもかかわらず、 β -アクチンと FLJ00018 との共発現により、FLJ00018 を介した SRE 活性が大きく抑制された。 β -アクチンと γ -アクチンを比較すると、 β -アクチンによる FLJ00018 を介した SRE 活性の抑制効果は、 γ -アクチンによる抑制効果より大きかった。一方、FLJ00018 は、三量体 G 蛋白質の G $\beta\gamma$ サブユニットによって活性化されることから、G $\beta\gamma$ サブユニットによる FLJ00018 の SRE 活性上昇に対するアクチンの影響を検討した。その結果、アクチンと FLJ00018 および G $\beta\gamma$ サブユニットを共発現させた細胞では、FLJ00018 とアクチンだけを共発現させた細胞に比べ、有意に SRE 活性上昇の抑制が見られた (Fig. 3-5)。

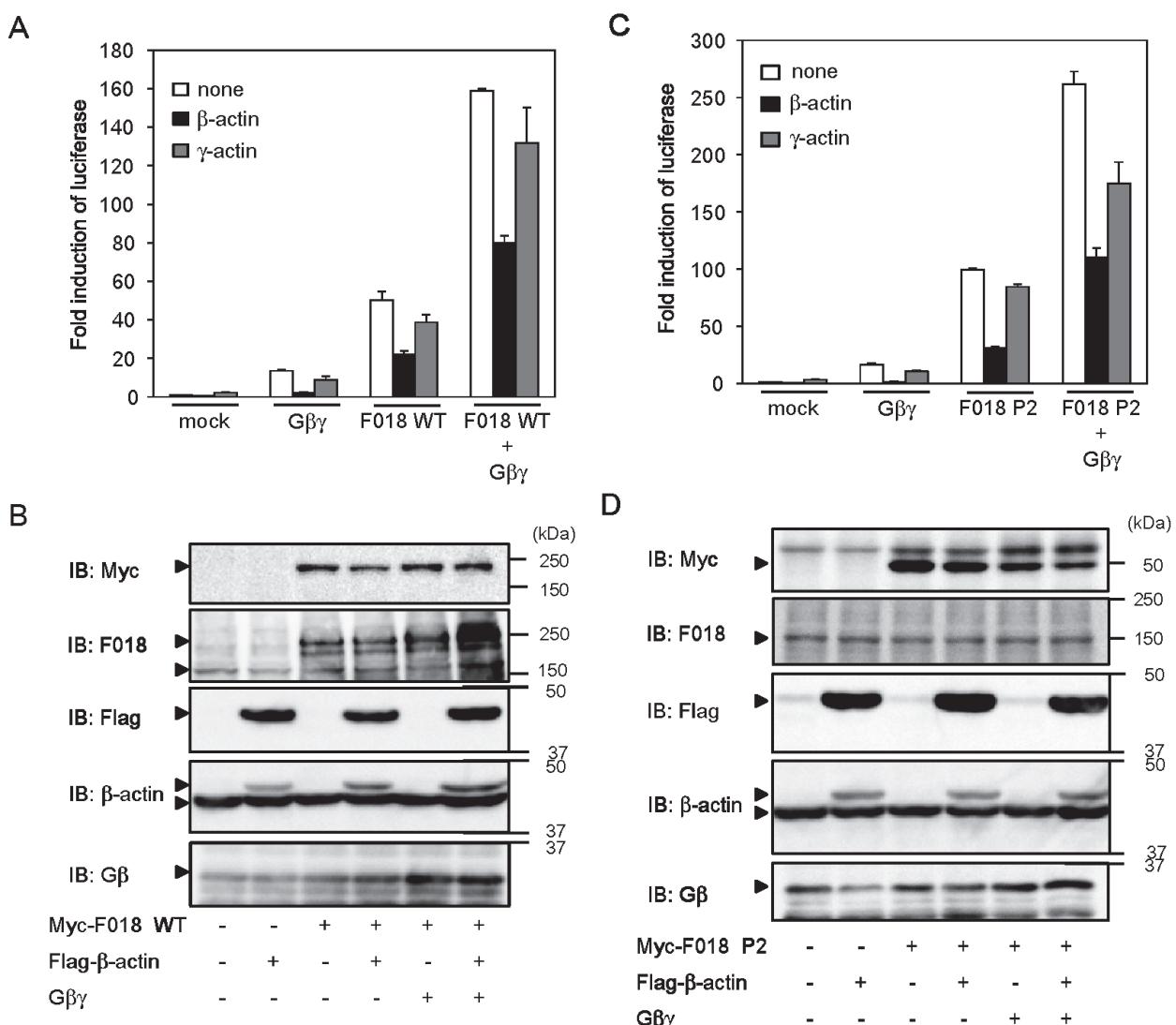


Fig. 3-5 アクチンが FLJ00018 を介した SRE 依存的転写活性に与える影響

A, C, HEK293 細胞に pSRE.L-luciferase, pRL-SV40 プラスミド DNA, FLJ00018 WT (A), FLJ00018 P2 (C), G β , G γ , β -及び γ -アクチンの発現ベクターをそれぞれ図に示したようにトランスフェクションした。ルシフェラーゼ活性は dual-luciferase reporter assay system によって測定し、得られた活性は Mock を 1.0 として標準化した値を示した。実験は少なくとも 3 回行い、値を平均値±S.D.で示した。

B, D, HEK293 細胞に、Myc タグを付加した FLJ00018 WT (B)または FLJ00018 P2 (D)、Flag タグを付加した β -及び γ -アクチン、そして G β , G γ の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション後、等量の蛋白質を 7.5% SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、FLJ00018 の検出には、Anti-PLEKHG2 抗体を用いた。Flag タグが付加された β -及び γ -アクチンの検出には、Anti-Flag 抗体を用い、 β -アクチンの検出には、Anti- β -アクチン抗体を用いた。さらに、G β サブユニットの検出に、Anti-G β 抗体を使用した。

β -アクチンが FLJ00018 の活性を抑制することを確かめる為、大腸菌 DH5 α より精製した GST-Rac G15A を用いた pull-down アッセイにより、FLJ00018 の RhoGTPase に対する GEF 活性を評価した。Rac G15A は、Rac のヌクレオチドフリー変異体であり、この変異体と結合する RhoGEF の量は、活性化した RhoGEF の指標とするとできるとされる (83)。Figure 3-6 に示したように、FLJ00018 のみを発現させ細胞に比べ、FLJ00018 と β -アクチンを共発現させた細胞において、GST-Rac G15A と共に沈降する FLJ00018 の量の減少がみられた。以上の結果より、FLJ00018 とアクチンの相互作用が FLJ00018 の活性を抑制する可能性が示唆された。

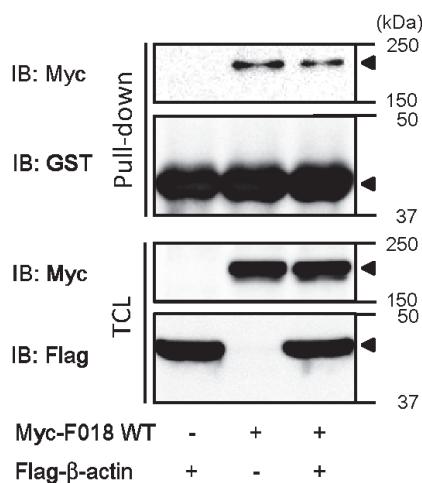


Fig. 3-6 アクチンが FLJ00018 の活性に与える影響

HEK293 細胞に、Myc タグを付加した FLJ00018 WT、Flag タグを付加した β -アクチンを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション後、細胞溶解液に、セファロースビーズが結合した GST-Rac G15A を加え、反応を行った。ビーズと結合した蛋白質を SDS-PAGE で分離し、それぞれ、図に示した抗体を用いてイムノプロットを行った。

5. β -アクチンが FLJ00018 と G $\beta\gamma$ との相互作用に与える影響

非筋細胞アクチンが FLJ00018 を介した SRE 依存的転写活性を抑制することから、FLJ00018 と G $\beta\gamma$ との相互作用にアクチンが与える影響について検討を行った。FLJ00018 と G $\beta\gamma$ 及び β -アクチンを HEK293 細胞にトランスフェクションし、免疫沈降により、FLJ00018 と相互作用する G $\beta\gamma$ 及び β -アクチンを検討した。Figure 3-7 に示す様に FLJ00018 と共に沈降する G $\beta\gamma$ の量は、 β -アクチンとの共発現により、変化は見られなかった。このことから β -アクチンと G $\beta\gamma$ の FLJ00018 との相互作用に関わる配列は異なる可能性が示唆された。

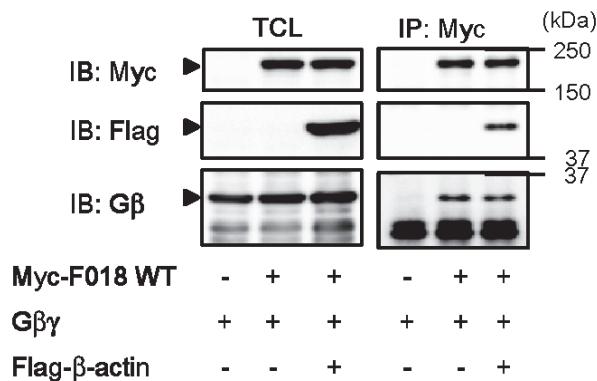
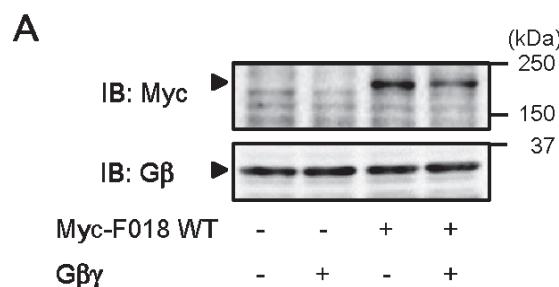


Fig. 3-7 FLJ00018 と G $\beta\gamma$ の結合に β -アクチンが与える影響

Myc タグを付加した FLJ00018 と Flag-タグを付加した β -アクチン、G β 及び G γ を HEK293 細胞内に一過性にトランスフェクションした。細胞の破碎後、抗 Myc 抗体を用いて FLJ00018 を免疫沈降した。免疫沈降後、SDS-PAGE で分離し、図に示した抗体を用いてイムノブロットを行った。

6. FLJ00018 とアクチンの細胞内における局在

細胞内における FLJ00018 と内因性のアクチンの局在について検討する為、NIH3T3 細胞に FLJ00018 及び G $\beta\gamma$ を一過性に発現させた (Fig. 3-8A, B)。この細胞を用い、細胞免疫染色を行い、FLJ00018 とアクチンのそれぞれの局在について検討したところ、FLJ00018 と G $\beta\gamma$ を共発現させた細胞において、FLJ00018 は線維状の F-アクチンと共に局在がみられた (Fig. 3-8C)。一方、FLJ00018 のみを発現させた細胞では、FLJ00018 は細胞膜付近の細胞の縁において F-アクチンと弱く結合していた。これらの結果から、FLJ00018 は、線維状 F-アクチンと相互作用することが示唆された。



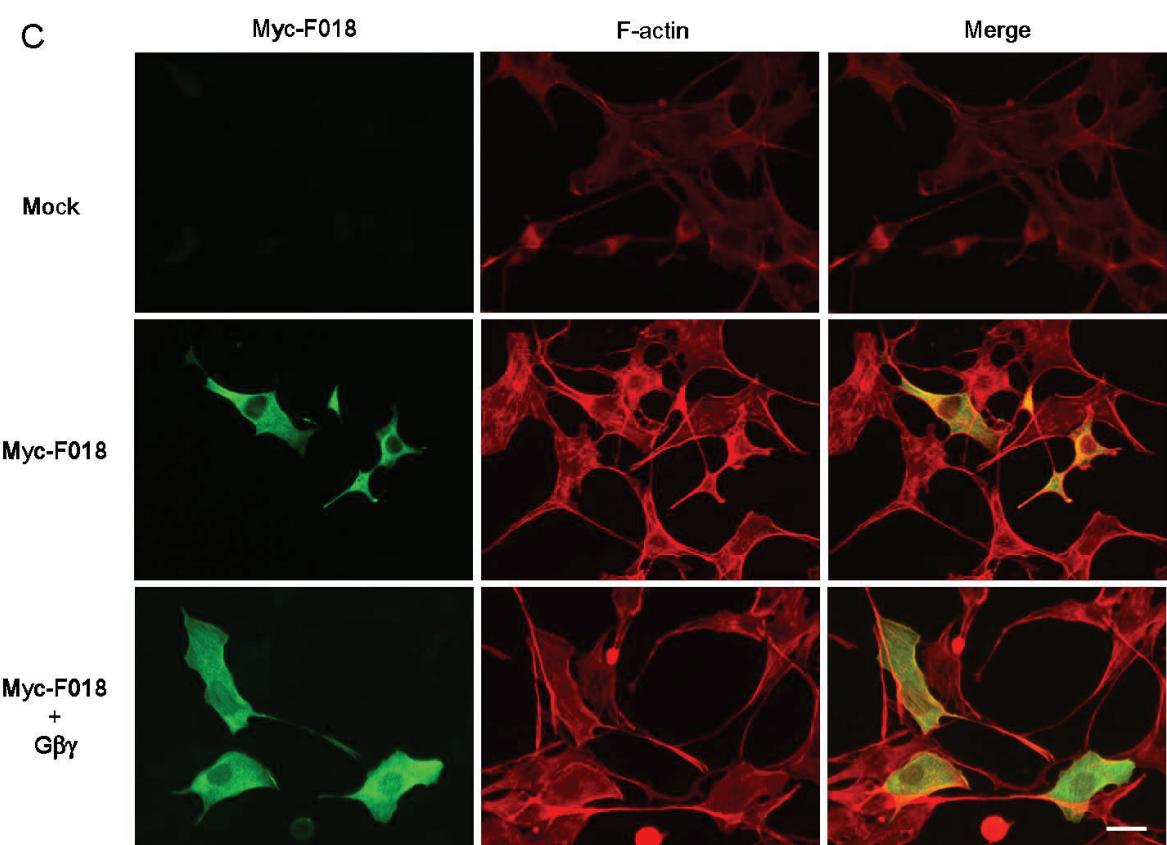
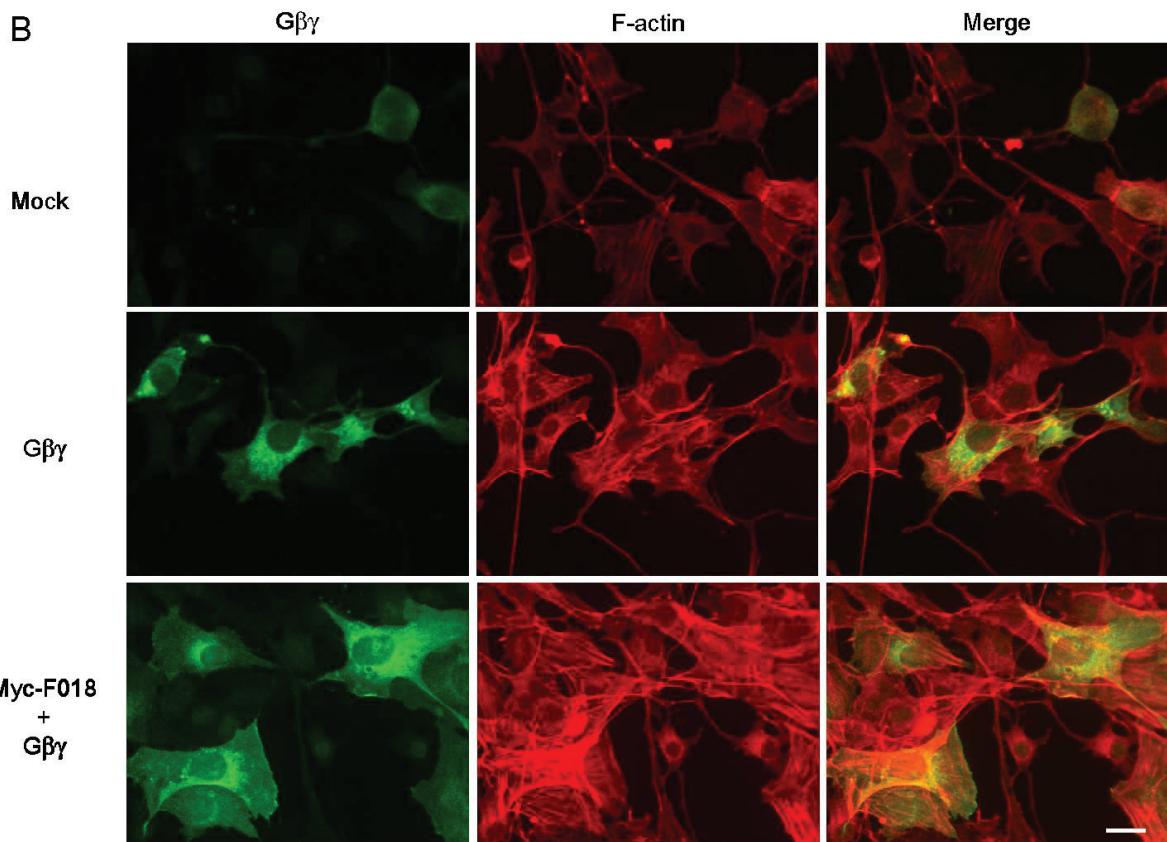


Fig. 3-8 FLJ00018 は内因性の線維状アクチンと共に局在する

A, NIH3T3 細胞に、Myc タグを付加した FLJ00018 WT 及び G β , G γ の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション後、等量の蛋白質を SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、G β サブユニットの検出に、Anti-G β 抗体を使用した。

B, C, NIH3T3 細胞に、Myc タグを付加した FLJ00018 WT 及び G β , G γ の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション後、細胞を固定し、G β (B)または、FLJ00018 (C)と F-アクチンを二重染色した。スケールバー, 20 μ m

第4節 考察

本研究において、G $\beta\gamma$ 依存的 RhoGEF である FLJ00018 が、G $\beta\gamma$ 以外に、アクチンと結合することを見出した。FLJ00018 とアクチンとの相互作用部位は 2箇所以上あることが示唆され、two-hybrid スクリーニング及び、免疫沈降の結果より、FLJ00018 のアクチン結合部位の 1つは、150-283 番目のアミノ酸に存在することが明らかとなった。過去、FLJ00018 は、N末端付近の配列において、G $\beta\gamma$ と相互作用することが示されている。しかし、アクチンと FLJ00018 の結合は、FLJ00018 と G $\beta\gamma$ との相互作用に影響を与えないことが示唆された。更に、本研究において、FLJ00018 は、線維状の β -アクチンと結合し、アクチンとの結合は、FLJ00018 の活性に対し、負の制御をすることが明らかとなった (Fig. 3-9)。

アクチンとの結合による FLJ00018 の活性抑制は、アクチンのアイソフォームによって違いが見られ、 γ -アクチンよりも β -アクチンとの結合による FLJ00018 の活性抑制効果の方が強いことが本研究で示唆された。いくつかの論文において、 β -アクチンと γ -アクチンの細胞内局在が異なるという報告がなされている (84,85)。このことから、FLJ00018 と β -アクチンおよび γ -アクチンの細胞局在の違いが、 β -アクチンおよび γ -アクチンの FLJ00018 の活性抑制に対する効果の違いに表れていることも考えられる。一方、本研究では、*in vitro* における FLJ00018 とアクチンの直接的な相互作用を確認することができなかった。また、 β -アクチンおよび γ -アクチンそれぞれのアイソフォームを用いた FLJ00018 との局在の違いを確認することもできなかった。今後さらなる検討が必要と考えられる。

最近、非筋細胞の myosin II が β -Pix を含む複数の Dbl ファミリーの RhoGEF と結合することが報告されている。myosin II との結合には DH, PH ドメイン付近の構造が関与し、結合によって RhoGEF の活性が抑制される (86)。また、 β -Pix-bL はチュブリリンやアクチンとそれぞれ N末端の calponin homology 及びシスティンリッチドメインを介して結合するという報告もある (87)。しかしながら、この結合の詳細なメカニズムは不明である。一方、RhoGEF の一種、PDZ-RhoGEF も、アクチンと結合するという報告があり、PDZ-RhoGEF とアクチンとの結合により、PDZ-RhoGEF の活性が抑制される (88,89)。これらの複数の RhoGEF がアクチンと結合し、またその結合を介して RhoGEF の活性が抑制されるという知見は、本研究で見出した

FLJ00018 の活性抑制機構と似ており、本研究を支持するものである。

PDZ-RhoGEF とアクチンとの結合においては、結合に関わる詳細なアミノ酸配列が明らかにされており、RhoGEF 中の L/I_{xx}FE という配列がアクチンとの結合に重要であることが報告されている (89)。FLJ00018 配列中には、662-667 番目の配列において、これに似た I_{xxx}FE という配列存在することから、今回見出した 2 つのアクチン結合領域の内、C 末端側のアクチン結合配列は、このアミノ酸がかかわっている可能性も考えられる。しかしながら、今回、同定したもう一つのアクチン結合領域である 150-283 番目のアミノ酸配列中には L/I_{xx}FE は存在しないことから、未知のアクチン結合配列が相互作用に関わっている可能性もあり、今後詳細な検討が必要と考えられた。更に、本研究で見出した FLJ00018 のアクチン結合領域である、150-283 番目のアミノ酸配列は、FLJ00018 とよく似た RhoGEF である、PLEKHG1 及び、PLEKHG3 の DH ドメインと高い相同意を示す (60% 程度) ことから、これらもアクチンとの結合に関わっている可能性も考えられた。

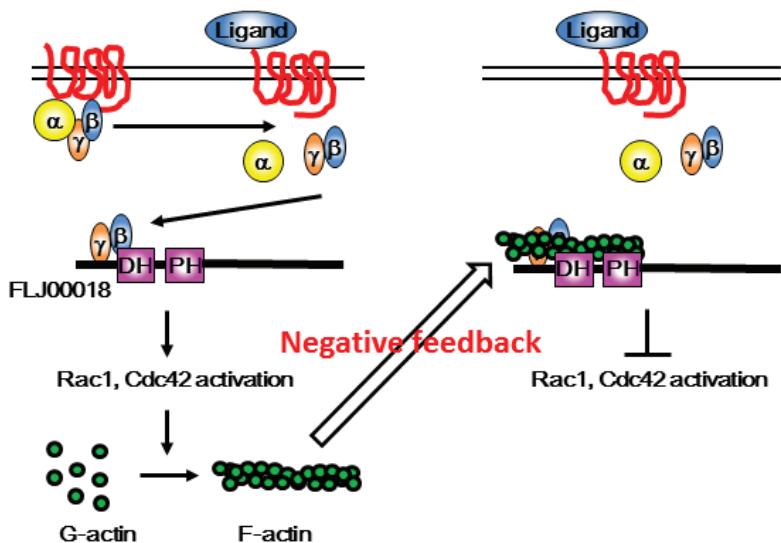


Fig. 3-9 アクチンによる FLJ00018 の活性抑制メカニズム

GPCR 刺激によって遊離した G $\beta\gamma$ による FLJ00018 の活性化の後、FLJ00018 はアクチン細胞骨格の再構築を引き起こす。これによって生成された F-アクチンが FLJ00018 の 150-283aa を含む領域と結合し、FLJ00018 の活性を抑制する。

第4章 FLJ00018とFour and a half LIMドメイン1(FHL1)との相互作用と活性調節

第1節 緒言

第3章において、FLJ00018の1-465番目のアミノ酸領域と相互作用する蛋白質を、酵母two-hybrid法を用いてスクリーニングし、得られた相互作用候補蛋白質の内、24クローンが、Genbankデータベース上の遺伝子配列と高い相同意を示した(>80%)。本章では、酵母two-hybrid法で得られた24クローンの内、非筋細胞アクチンとは別の蛋白質である、Four and a half LIM domain 1 (FHL1)に着目し、相互作用の確認及び、相互作用が担う生理的役割について検討を行った。

FHL蛋白質は、骨格筋細胞で多く発現しており、myopathyの発症に関わることが示唆されている(90,91)。骨格筋細胞での働きについては、いくつかの研究報告がされており、FHL3がアクチンと結合し、 α -アクチニンを介したアクチンの束化に寄与するという報告や、FHL1が骨格筋においてミオシン結合蛋白質と相互作用するという報告がある(92,93)。

FHL1は、骨格筋以外にも脳や肺、肝臓などにおいても発現していることが報告されている(94)。特に、マウスの発生段階において、大脳においてFHL1の発現に差が見られ、前部においてFHL2が、後部においてFHL1のmRNAが多く発現していることが分かっているが、FHL1ノックアウトマウスにおいて、蛋白質発現の変化は見られず、FHL1, FHL2のmRNA量の変化の意義についてはあまりわかつていない(95)。また、FHL1は、Srcによって、リン酸化されたCrk-associated substrate(Cas)によって発現量が抑制され、これがSrcによるがん細胞の浸潤の獲得に寄与しているというメカニズムが提唱されている(96)。しかしながら、骨格筋細胞以外でのFHL1の働きについては、このように、散発的な知見しか得られておらず、FHL1の働きについてはまだあまり解明が進んでいない。

今回two-hybridで用いたpreyの遺伝子が脳のcDNA由来であることから、FLJ00018とFHL1の相互作用が、脳内で何らかの機能を果たしている可能性も考えられる。また、FHL1が、がんの浸潤性との関連性が指摘されていることから、FLJ00018とFHL1との相互作用が

細胞形態制御機構で重要な働きをしている可能性も考えられる。以上のことと踏まえ、本章では、
FHL1 と FLJ00018 の相互作用の詳細、及び相互作用が担う生理的意義の解明を試みた。

第2節 実験材料および方法

1. プラスミドと試薬

FHL1A 及び FHL1B の ORF は、cDNA ライブラリーを基に PCR 法によって増幅させ、pF5A-Flag ベクターに組み込まれた。FLJ00018 の各種欠損変異体、pSRE.L-luciferase reporter、pRL-SV40、pF5A-CMV-neo-G β_1 及び、pF5A-CMV-neo-G γ_2 は第 1 章及び、第 3 章で述べたプラスミドと同一である。

2. 細胞培養とトランスフェクション

HEK293 細胞、Neuro-2a 細胞は、37°C, 5% CO₂ 加湿大気圧下で、10% FBS を添加した DMEM で培養した。一過性のトランスフェクションは Lipofectamine2000 試薬を用いて製品の使用法に従って行った (Life Technologies)。SRE 依存的遺伝子転写活性測定には 0.4 μg の DNA を、イムノプロット解析には 1 μg の DNA を、免疫沈降法および pull-down アッセイには 2 μg の DNA を用いた。トランスフェクション後、細胞を 37°C で 6-8 時間培養し、その後、細胞を無血清培地に置き換え、16-18 時間培養した。

3. Serum response element 依存的転写活性 (SRE 活性) 測定

24 穴プレートに播かれた細胞に各種発現プラスミドとともに pRL-SV40 コントロールレポータープラスミド、pSRE.L-luciferase プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクション後、細胞を氷冷 PBS で 1 回洗浄後、細胞溶解液を用いて細胞を溶解した。細胞溶解液を 13200 rpm, 10 min で遠心後、上清を分離した。ルシフェラーゼ活性測定は dual luciferase reporter assay system (Promega) を用いて、製品の使用方法に従って行った。レポーター活性はコントロールベクターの活性に対して標準化し、データは実験の平均値±S.D. を示した。

4. 免疫沈降

6 cm dish に一過性にトランスフェクションされた細胞を 300 μl の細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 0.5% Nonidet P-40,

phosphase inhibitor, protease inhibitor) 中で溶解した。溶解液を 13200 rpm, 10 min で遠心後、上清の一部を分けとり、残りの上清に 1.0 µg の Anti-Myc 抗体または 1.0 µg の Anti-Flag 抗体を加え、4°Cで 2 時間ローテーションを行った。その後 protein G-agarose を加え、4°Cで 1 時間、ローテーションを行った。ビーズを wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 0.1% Nonidet P-40, phosphase inhibitor solution, protease inhibitor)で 3 回洗浄後、ビーズに結合した蛋白質を sample buffer 中で溶出した。一定量の免疫沈降物は SDS-PAGE で分離され、蛋白質はイムノプロット法を用いて検出した。

5. 細胞免疫染色と細胞形態の観察

カバーガラス上で、蛍光蛋白質 pFN21A-mAG-FLJ00018 を含む蛋白質を一過性に強制発現させた細胞を氷冷 PBS で一回洗浄後、30 分間、4% パラホルムアルデヒド固定させた。固定した細胞に 0.1% Triton-X 処理を行い、PBS で 4 回洗浄後、10% goat serum で 1 時間ブロッキンゲした。その後、Anti-Flag 抗体で 1 時間ラベルし、さらに、抗マウス IgG-Alexa-Flour568 で染色した。染色したカバーガラスは、Perma Fluor で処理させ、蛍光イメージを蛍光顕微鏡により観察した (BZ-9000; KEYENCE)。

第3節 結果

1. FLJ00018 相互作用分子としての Four and a half LIM domain1 (FHL1) の同定

第3章において、FLJ00018 の 1-465 番目のアミノ酸配列を用いて two-hybrid スクリーニングを行い、121 の陽性クローンを見出した。この内 24 クローンが、Genbank データベース上の遺伝子配列と高い相同意を示した (>80%)。第3章では、この 24 クローンの内の 1 つ、非筋細胞アクチンが FLJ00018 の機能に対し、抑制的に働くことを見出した。ここでは、アクチンとは別の遺伝子についてさらに解析を進め、クローン番号 5-1 の自立活性化能を試験した結果を示す (Fig. 4-1)。左下の写真に示すように、コントロールベクターと 5-1 を形質転換した酵母は選択培地に生存できず、右下の写真に示すように、bait と 5-1 の形質転換は存在できることから、陽性であることが確認できる。この遺伝子の配列の配列を調べたところ、Four and a half LIM domain1 (FHL1) と高い相同意を有することが明らかとなった。

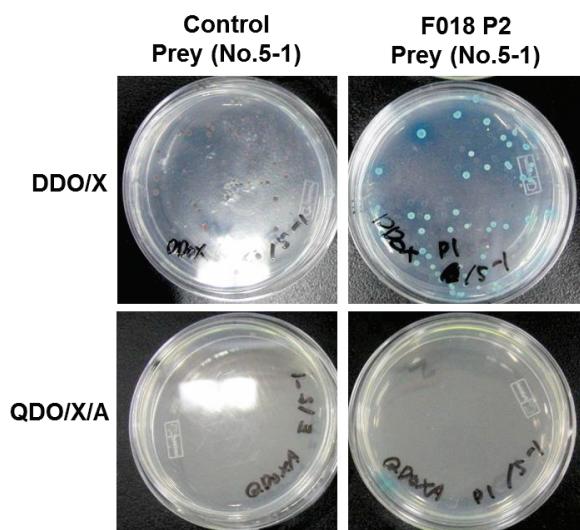


Fig. 4-1 FLJ00018 1-465aa (Bait) とクローン 5-1 (Prey) の相互作用
pGBKT7-FLJ00018 1-465aa または、pGBKT7-DNA-BD を pGADT7-5-1 とともに酵母 Y2H Gold 株にトランスフォームし平板培地で培養した。上段(DDO/X); トリプトファン、ロイシンを除いた SD 培地、下段(QDO/X/A); トリプトファン、ロイシン、アデニン、ヒスチジンを除いた SD 培地。

2. 培養細胞内における FLJ00018 と FHL1 との相互作用

FHL1 は蛋白質間相互作用に関わる LIM ドメインを有するアダプター蛋白質のひとつである。LIM ドメインは、システインリッチな CX₂CX₁₆₋₂₃HX₂CX₂CX₂CX₁₆₋₂₁CX(C,H,D) 配列を持ち、2 つの Zinc と結合する Zinc フィンガー構造である。FHL 蛋白質は、FHL1-4, ACT の 5 つのメンバーで構成されており、FHL1 にはさらに、FHL1A, 1B, 1C の 3 つのアイソフォームが存在す

ることが知られている (97)。FHL1A は、配列中に 4 つの LIM ドメインを有しているが、FHL1B は、3 つの LIM ドメインで構成されており、C 末端に特徴的な核移行シグナル (NLS) を持つ。今回、two-hybrid で得られた配列は、FHL1A 及び FHL1B の LIM2 及び 3 に共通する配列であることが明らかとなった (Fig. 3-2A)。そこで、Flag-タグを付加した FHL1A 及び FHL1B を作成し、Myc タグを付加した FLJ00018 と共に HEK293 細胞に共発現させ、免疫沈降を行うことにより、培養細胞内における相互作用を確認した。その結果、Figure 3-2B に示す様に、FLJ00018 WT と共に沈降する FHL1A 及び、FHL1B が見られた。このことから、FLJ00018 は哺乳類培養細胞においても FHL1A 及び、FHL1B と相互作用する可能性が示唆された。しかしながら、FLJ00018 と共に沈降する FHL1B の量よりも FHL1A の量の方が多かった。このことは、FHL1B が NLS 配列を持ち、多くが核に局在する (98) ことと関係しているものと考えられた。

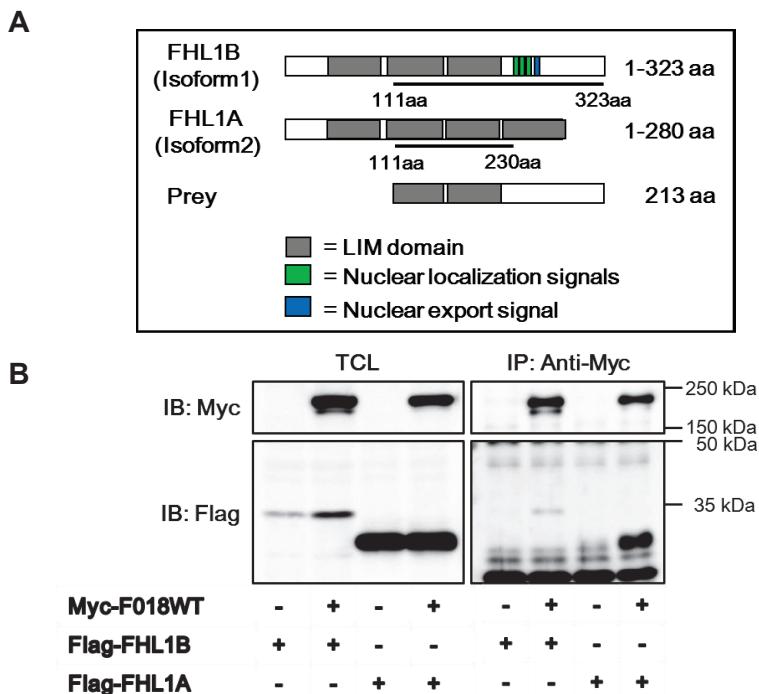


Fig. 4-2 FLJ00018 と FHL1 との相互作用

A, FHL1 の構造。prey は、酵母 two-hybrid で FLJ00018 と相互作用する配列として同定された配列であり、それぞれのアイソフォームの下線部分の配列と相同性を示す。

B, HEK293 細胞に Myc タグを付加した FLJ00018WT と、Flag-タグを付加した FHL1A 及び FHL1B を図に示したように一過性にトランスフェクションした。細胞の破碎後、抗 Myc 抗体を用いて FLJ00018 を免疫沈降した。免疫沈降後、SDS-PAGE で分離した。イムノブロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、Flag タグが付加された FHL1 の検出の為に、Anti-Flag 抗体を用いた。

3. FHL1 との相互作用に関わる FLJ00018 上の配列

アクチンとの相互作用について検討したのと同様に、FHL1 と酵母 two-hybrid 法で用いた FLJ00018 の 1-465 番目のアミノ酸以外の配列において相互作用する領域が存在するか検討する為、FLJ00018 P2 及び、FLJ00018 ΔNT を FHL1 と共に HEK293 細胞内に導入し免疫沈降を行った。その結果、two-hybrid で用いた FLJ00018 の 1-465 番目のアミノ酸を含む P2 配列以外に、FLJ00018 ΔNT においても FHL1 との共沈降が見られた (Fig. 4-3A, B)。このから、FLJ00018 の配列内には、少なくとも 2 箇所以上の FHL1 相互作用領域が存在する可能性が示唆された。

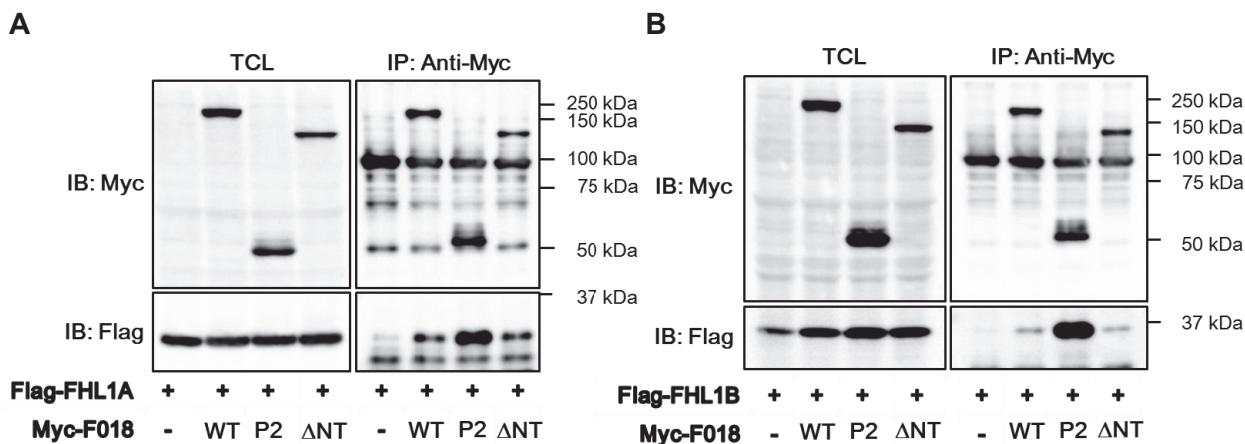


Fig. 4-3 FLJ00018 ΔNT 変異体と FHL1 との相互作用

A, B HEK293 細胞に Myc タグを付加した FLJ00018WT または、FLJ00018 P2, FLJ00018 ΔNT を、Flag-タグを付加した FHL1A (A) 及び FHL1B (B) と一過性にトランスフェクションした。細胞の破碎後、抗 Myc 抗体を用いて FLJ00018 を免疫沈降した。免疫沈降後、SDS-PAGE で分離した。イムノブロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、Flag タグが付加された FHL1 の検出の為に、Anti-Flag 抗体を用いた。

4. FHL1 との相互作用に関わる FLJ00018 P2 上の配列の同定

FLJ00018 の 1-465 番目の領域における相互作用部位の詳細についてさらに解析を進める為、1-465aa の N 末端及び C 末端から順に欠損させた変異体を用い (第 3 章 Fig. 3-4A)、FHL1A との相互作用を免疫沈降法により検討した。まず、bait の配列である P2 と各種 N 末端欠損変異体である P2 ΔN1 変異体、P2 ΔN2 変異体、P2 ΔN3 変異体と FHL1A との相互作用について検討を行った。その結果、bait と同様の配列をもつ F018 P2 の他に、P2 ΔN1 では FHL1A との相互作用が見られたが、P2 ΔN2 及び P2 ΔN3 では FHL1A との相互作用は見られなかった。

(Fig. 4-4A)。次に、bait として使用した P2 変異体内の C 末端側を欠損させた P2 Δ C1, P2 Δ C2, P2 Δ C3 及び PH 変異体と FHL1A との相互作用について検討を行った。その結果、P2 Δ C1, P2 Δ C2 及び、P2 Δ C3 では FHL1A との相互作用が確認できたが、PH では相互作用が確認できなかった (Fig. 4-4B)。以上の結果より、FHL1 は FLJ00018 P2 内では β -アクチンとの相互作用領域とは異なり、FLJ00018 の N 末端に近い 58 番目から 150 番目のアミノ酸配列が、相互作用に必要な配列であることが示唆された。

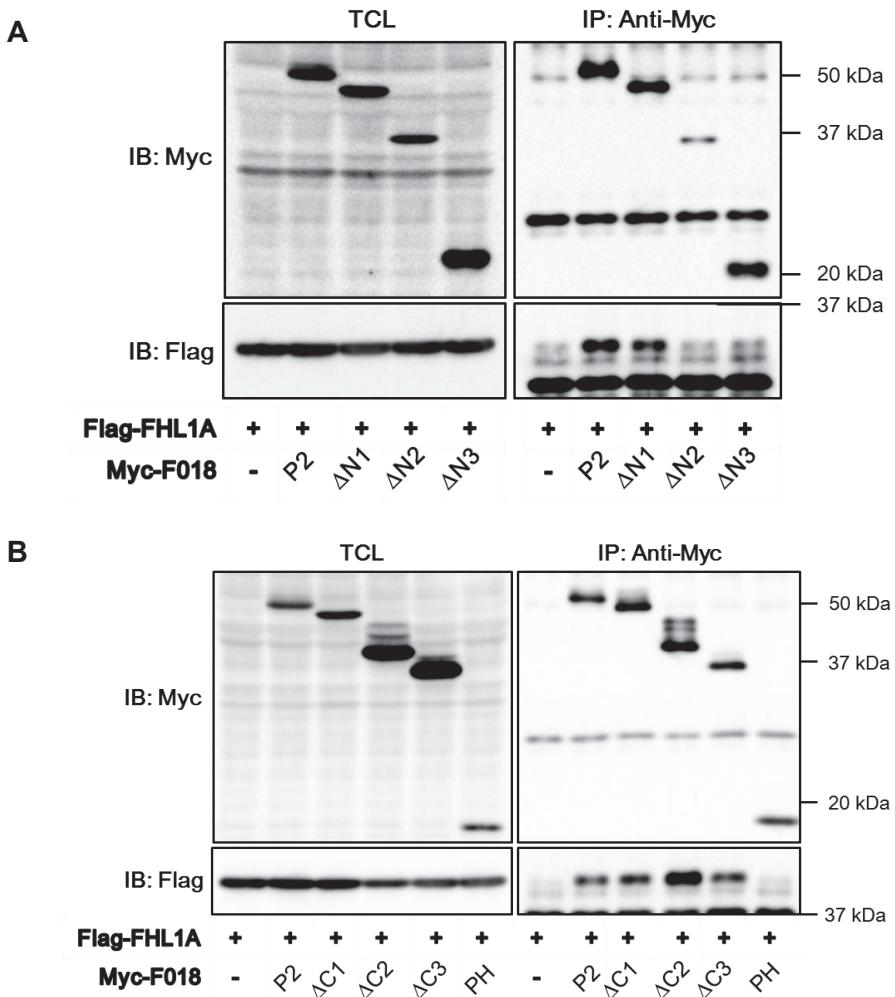


Fig. 4-4 FLJ00018 P2 領域における FHL1 との相互作用領域の同定

A, B, Myc タグを付加した FLJ00018 の各種変異体と Flag タグを付加した FHL1A を HEK293 細胞内に一過性にトランسفェクションした。細胞の破碎後、抗 Myc 抗体を用いて FLJ00018 を免疫沈降した。免疫沈降後、SDS-PAGE で分離した。イムノプロットは、Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、Flag タグが付加された FHL1 の検出の為に、Anti-Flag 抗体を用いた。

5. FHL1 が FLJ00018 を介した SRE 依存的転写活性に与える影響

これまでの結果より、FLJ00018 の相互作用に関わるアミノ酸配列を比較すると、アクチンと FHL1 で異なることが明らかとなった。そこで、FHL1 が、FLJ00018 の活性にどのような影響を与えるのかについて調べるために、FHL1A および FHL1B を、FLJ00018 WT および、P2 とそれぞれ共発現させた細胞を用い、FLJ00018 活性化の指標である SRE 活性測定を行なった。

その結果、Figure 4-5A に示す様に、FHL1A と FLJ00018 との共発現により、FLJ00018 を介した SRE 活性が大きく増強された。一方、FHL1B と FLJ00018 との共発現では、FLJ00018 の活性上昇は見られなかった。この時、それぞれの蛋白質の発現に顕著な差異は見られなかつたことから、SRE 活性の変化は蛋白質発現量の変化によるものではないことが示唆された (Fig. 4-5B)。

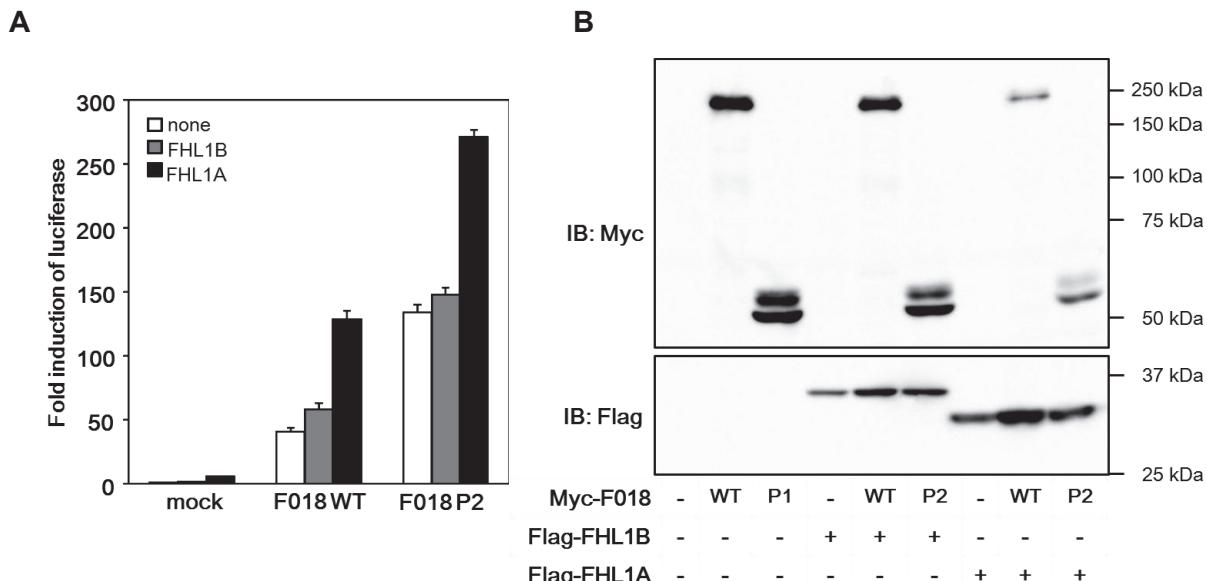


Fig. 4-5 FHL1 が FLJ00018 を介した SRE 依存的転写活性に与える影響

A, HEK293 細胞に pSRE.L-luciferase, pRL-SV40 プラスミド DNA, FLJ00018 WT, FLJ00018 P2, FHL1A 及び 1B の発現ベクターをそれぞれ図に示したようにトランスフェクションした。ルシフェラーゼ活性は dual-luciferase reporter assay system によって測定し、得られた活性は Mock を 1.0 として標準化した値を示した。実験は少なくとも 3 回行い、値を平均値±S.D.で示した。

B, HEK293 細胞に、Myc タグを付加した FLJ00018 WT または FLJ00018 P2, Flag タグを付加した FHL1A 及び FHL1B の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスクレーバー後、等量の蛋白質を SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、Flag タグが付加された FHL1 の検出には、Anti-Flag 抗体を使用した。

一方、FLJ00018 P2 領域における FHL1 の結合部位は、FLJ00018 と三量体 G 蛋白質の G $\beta\gamma$ サブユニットの結合領域に近いことから、G $\beta\gamma$ サブユニットによる FLJ00018 の SRE 活性上昇に対する FHL1 の影響を検討した。その結果、FHL1A との共発現によって、G $\beta\gamma$ による FLJ00018 の活性上昇をさらに上昇させることができた (Fig. 4-6A, D)。また、この時の蛋白質発現もそれぞれの蛋白質との共発現によって差異は見られなかった (Fig. 4-6B-C, E-F)。以上の結果より、FHL1A は、FLJ00018 を介した SRE 依存的転写活性を上昇させることが明らかとなり、FLJ00018 を活性化することが示唆された。

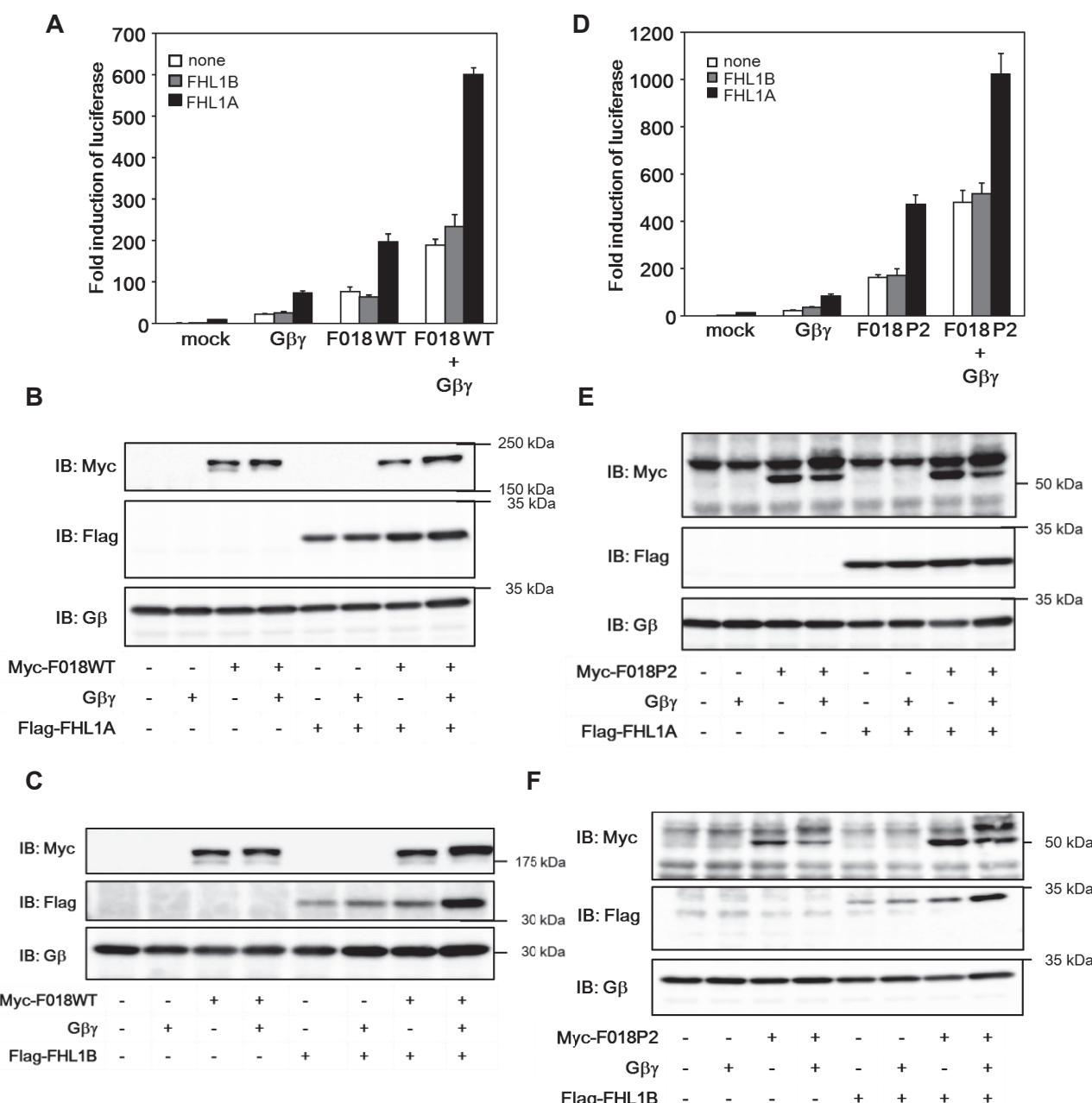


Fig. 4-6 FHL1 が G $\beta\gamma$ によって活性化された FLJ00018 を介した SRE 依存的転写活性に与える影響
A, D HEK293 細胞に pSRE.L-luciferase, pRL-SV40 プラスミド DNA, FLJ00018 WT (A), FLJ00018 P2 (D), G β , G γ , FHL1A 及び FHL1B の発現ベクターをそれぞれ図に示したようにトランスフェクションした。ルシフェラーゼ活性は dual-luciferase reporter assay system によって測定し、得られた活性は Mock を 1.0 として標準化した値を示した。実験は少なくとも 3 回行い、値を平均値± S.D. で示した。

B-C, E-F HEK293 細胞に、Myc タグを付加した FLJ00018 WT (B, C) または FLJ00018 P2 (E, F)、Flag タグを付加した FHL1A 及び 1B、そして G β , G γ の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション後、等量の蛋白質を SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、Flag タグが付加された FHL1 の検出には、Anti-Flag 抗体を用い、さらに、G β サブユニットの検出に、Anti-G β 抗体を使用した。

6. FHL1 が FLJ00018 と G $\beta\gamma$ の相互作用に与える影響

これまでの結果より、FHL1A は、FLJ00018 を介した SRE 依存的転写活性を活性化し、また、FLJ00018 との相互作用は、G $\beta\gamma$ との相互作用領域と似た領域において生じている可能性が考えられた。そこで、FHL1A が FLJ00018 と G $\beta\gamma$ との相互作用に与える影響について検討を行った。FLJ00018 と G $\beta\gamma$ 及び FHL1A を HEK293 細胞に共発現させ、免疫沈降により、FLJ00018 と相互作用する G $\beta\gamma$ 及び FHL1A を検討した。Figure 4-7A に示す様に FLJ00018 と共に沈降する G $\beta\gamma$ の量は、FHL1A との共発現によって変化は生じなかった。また、逆に、G $\beta\gamma$ が、FLJ00018 と FHL1A との相互作用に与える影響について検討を行ったところ、FLJ00018 と共に沈降する FHL1A の量は、G $\beta\gamma$ との共発現によって変化は生じなかった (Fig. 4-7B)。これらの結果より、FLJ00018 と FHL1A, G $\beta\gamma$ の相互作用領域が近い領域で生じていると考えられたにも関わらず、FHL1A と G $\beta\gamma$ は、競合することなく FLJ00018 と相互作用していることが示唆された。次に、FHL1A, G $\beta\gamma$ そして FLJ00018 が複合体を形成しているかを検討する為、FHL1A と G $\beta\gamma$ を HEK293 細胞内に共発現させ、免疫沈降によって相互作用の有無の確認を行った。その結果、Figure 4-7C に示す様に、FHL1A と G $\beta\gamma$ の共沈降が見られ、FHL1 と FLJ00018, G $\beta\gamma$ と FLJ00018 の相互作用に加え、G $\beta\gamma$ と FHL1A も相互作用することが明らかとなり、三者が複合体を形成することが示唆された。

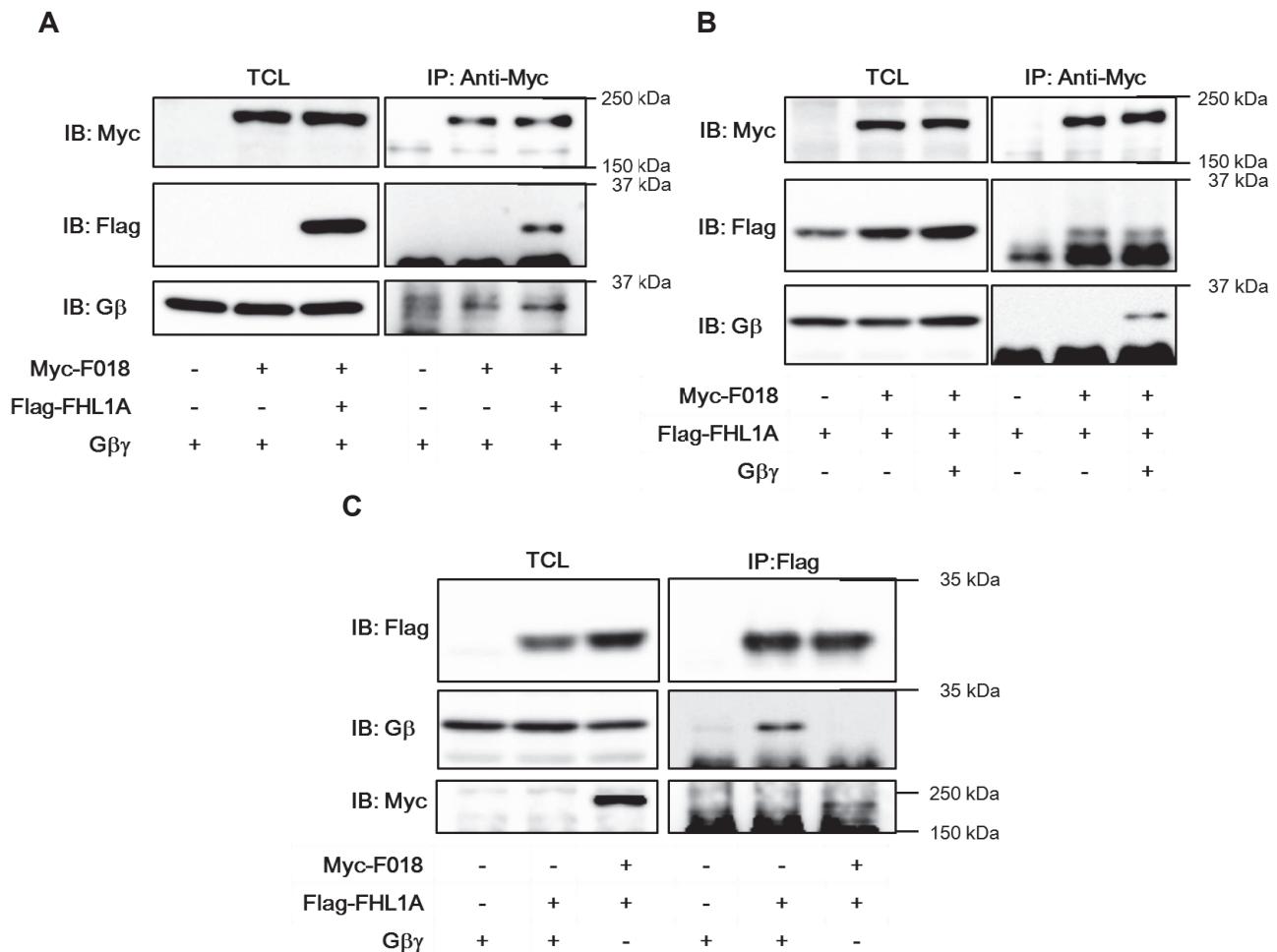


Fig. 4-7 FHL1 が FLJ00018 と G $\beta\gamma$ の結合に与える影響

A, B, Myc タグを付加した FLJ00018 と Flag-タグを付加した FHL1A, G β 及び G γ を HEK293 細胞内に一過性にトランスフェクションした。細胞の破碎後、抗 Myc 抗体を用いて FLJ00018 を免疫沈降した。免疫沈降後、SDS-PAGE で分離し、図に示した抗体を用いてイムノプロットを行った。C, Myc タグを付加した FLJ00018 と Flag タグを付加した FHL1A, G β 及び G γ を HEK293 細胞内に一過性にトランスフェクションした。細胞の破碎後、抗 Flag 抗体を用いて FHL1A を免疫沈降した。免疫沈降後、SDS-PAGE で分離し、図に示した抗体を用いてイムノプロットを行った。

7. FHL1 による FLJ00018 を介した SRE 活性上昇に対するアクチンの影響

FHL1A と FLJ00018 の共発現による FLJ00018 を介する SRE 活性上昇が明らかとなり、この活性上昇には、FHL1 と G $\beta\gamma$, FLJ00018 の三者の複合体形成が関与していることが示唆された。一方、第 3 章において、 β -アクチンは、FLJ00018 と結合し、FLJ00018 の活性を抑制することを示した。また、 β -アクチンは、G $\beta\gamma$ によって活性化された FLJ00018 の活性も抑制し、 β -アクチンによる FLJ00018 の負のフィードバック機構が示唆された。そこで、FHL1 による

FLJ00018 の活性化に対する β -アクチンの影響について検討した。FLJ00018, FHL1 及び β -アクチンを HEK293 細胞内に共発現させ、SRE 活性測定を行ったところ、FHL1 による FLJ00018 の SRE 活性上昇の抑制がみられた (Fig. 4-8A)。この時、それぞれの蛋白質発現の変化は見られなかったことから (Fig. 4-8B)、FHL1 による FLJ00018 の活性化に対しても、 β -アクチンが FLJ00018 活性の抑制に働くことが示唆された。

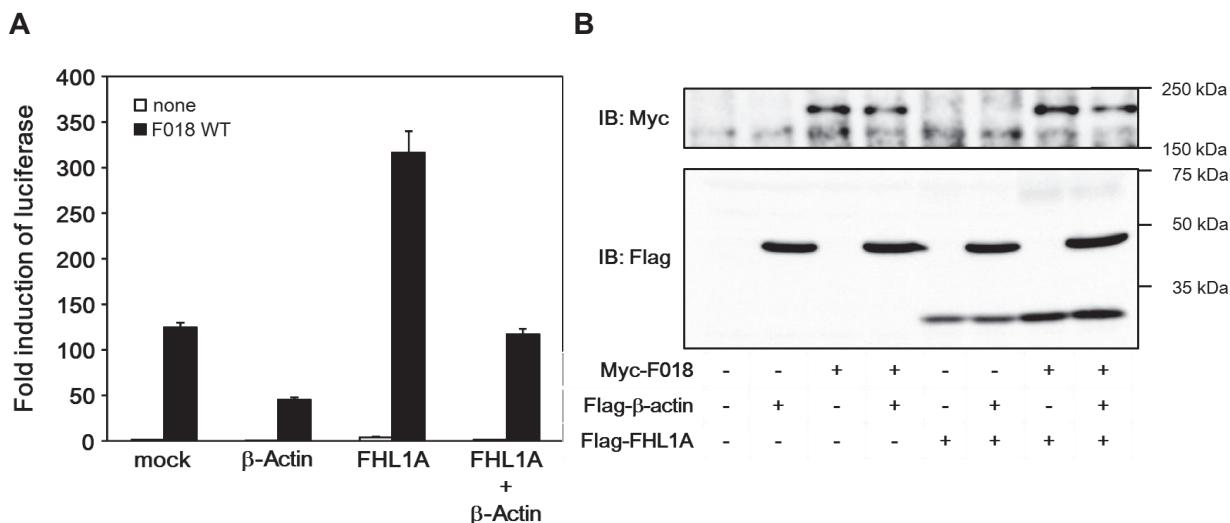


Fig. 4-8 β -アクチンが FHL1 による FLJ00018 を介する SRE 活性上昇に与える影響

A, HEK293 細胞に pSRE.L-luciferase, pRL-SV40 プラスミド DNA, FLJ00018 WT, FHL1A 及び β -アクチンの発現ベクターをそれぞれ図に示したようにトランスフェクションした。ルシフェラーゼ活性は dual-luciferase reporter assay system によって測定し、得られた活性は Mock を 1.0 として標準化した値を示した。実験は少なくとも 3 回を行い、値を平均値 \pm S.D. で示した。

B, HEK293 細胞に Myc タグを付加した FLJ00018 WT, Flag タグを付加した FHL1A 及び、 β -アクチンの発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション後、等量の蛋白質を SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、Flag タグが付加された FHL1 と β -アクチンの検出には、Anti-Flag 抗体を使用した。

8. FLJ00018 と FHL1 の細胞内における局在及び細胞形態変化

細胞内における FLJ00018 と FHL1 の局在について検討する為、Neuro-2a 細胞に FLJ00018 及び FHL1, G $\beta\gamma$ を発現させ、免疫沈降を行ったところ、Neuro-2a 細胞内においても HEK293 細胞同様、FHL1A 及び、FHL1B との相互作用が見られた (Fig. 4-9A, D)。また、FLJ00018 を介する SRE 活性についても検討を行ったところ、FHL1A による FLJ00018 の活性上昇がみられ (Fig. 4-9B, E)、Neuro-2a 細胞においても、FHL1 は、HEK293 細胞と同様の機構によつて FLJ00018 の活性を制御しうることが確認できた。

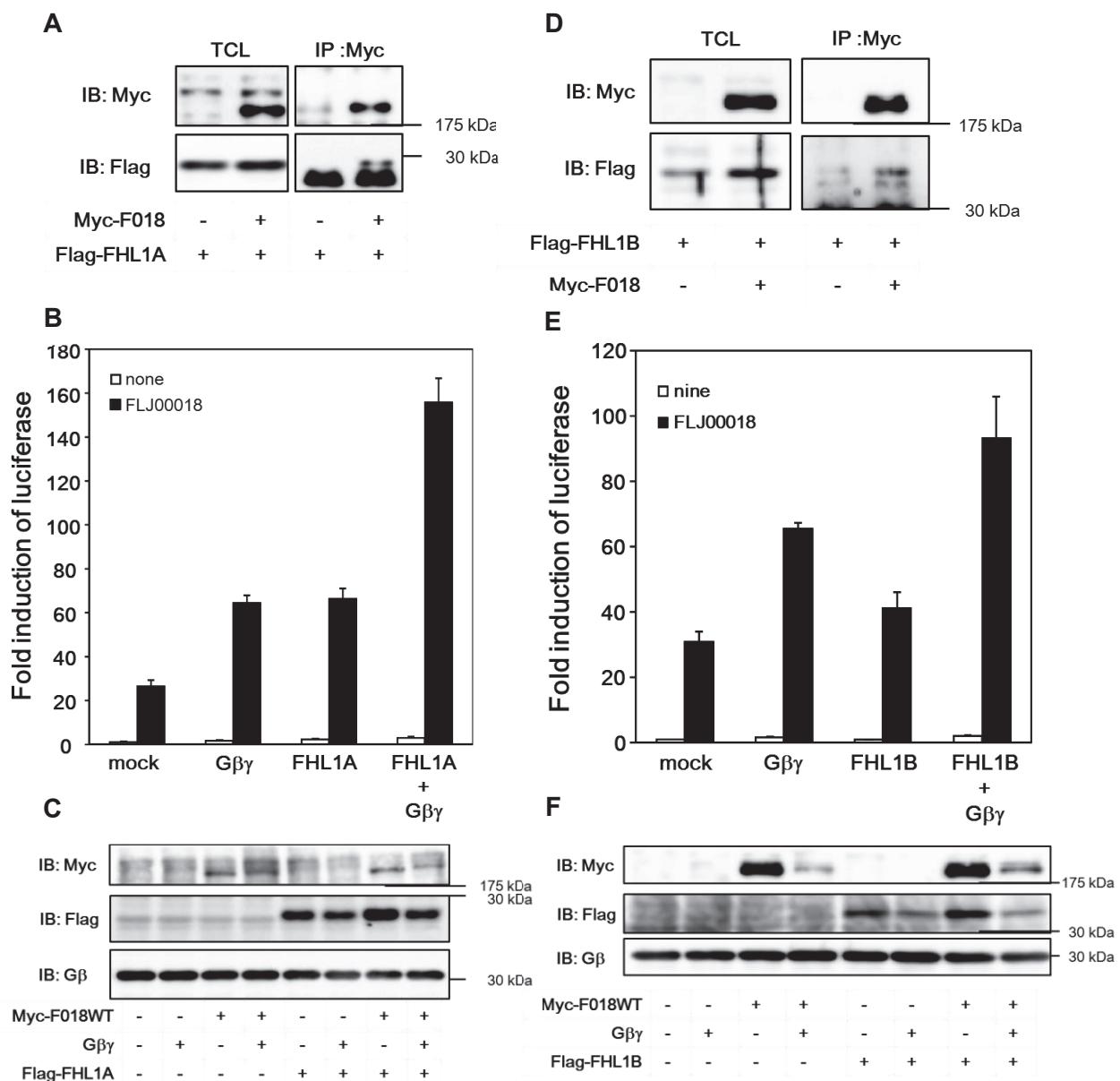


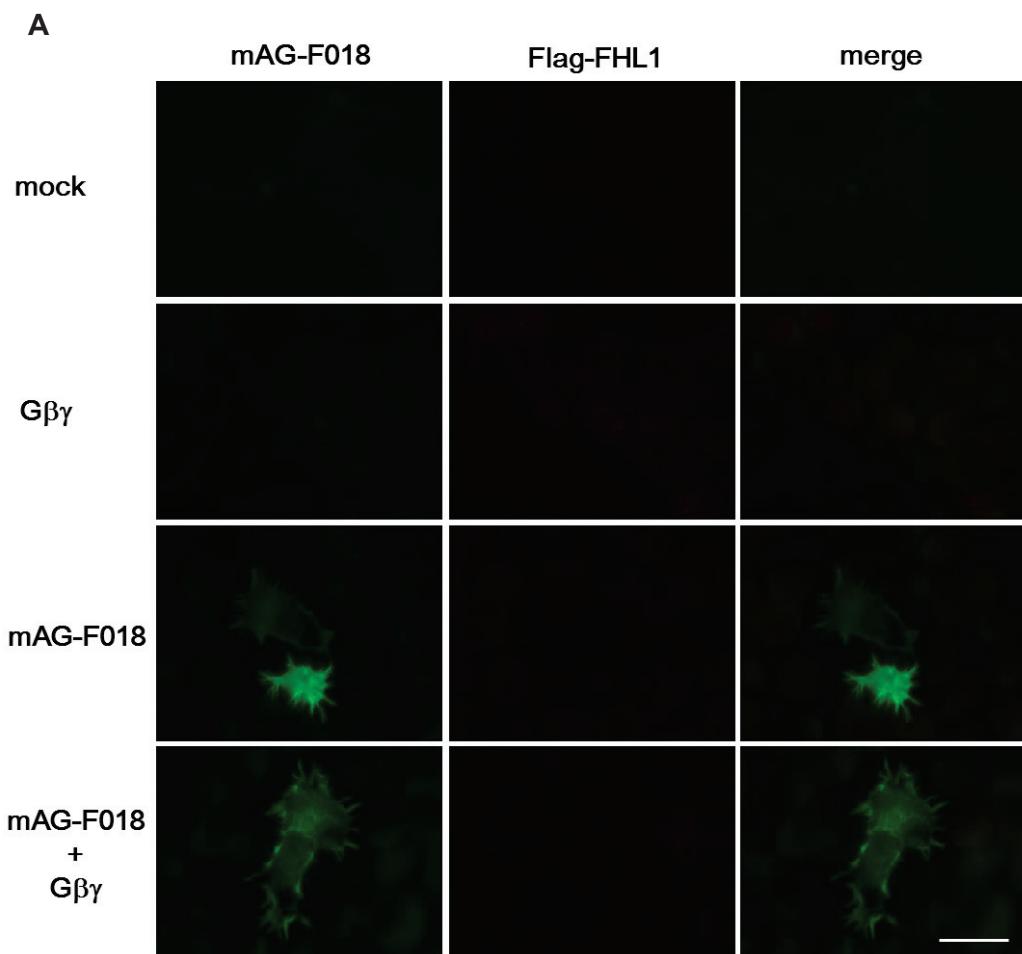
Fig. 4-9 Neuro-2a 細胞における FHL1 と FLJ00018 の相互作用と FLJ00018 の活性化

A, D, Myc タグを付加した FLJ00018 と Flag タグを付加した FHL1A 及び FHL1B を Neuro-2a 細胞内に一過性にトランスフェクションした。細胞の破碎後、抗 Myc 抗体を用いて FLJ00018 を免疫沈降した。免疫沈降後、SDS-PAGE で分離し、図に示した抗体を用いてイムノブロットを行った。

B, E, Neuro-2a 細胞に pSRE.L-luciferase, pRL-SV40 プラスミド DNA, FLJ00018 WT, FHL1A 及び FHL1B, G β , G γ の発現ベクターをそれぞれ図に示したようにトランスフェクションした。ルシフェラーゼ活性は dual-luciferase reporter assay system によって測定し、得られた活性は Mock を 1.0 として標準化した値を示した。実験は少なくとも 3 回行い、値を平均値± S.D. で示した。

C, F, Neuro-2a 細胞に Myc タグを付加した FLJ00018 WT, Flag タグを付加した FHL1A 及び FHL1B, G β , G γ の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション後、等量の蛋白質を SDS-PAGE で分離した。Myc タグが付加された FLJ00018 の検出の為に、Anti-Myc 抗体を用い、Flag タグが付加された FHL1 の検出には、Anti-Flag 抗体を使用した。また、G β の検出には Anti-G β 抗体を用いた

この条件の Neuro-2a 細胞を用いて、細胞免疫染色を行い、FLJ00018 と FHL1A, FHL1B のそれぞれの局在について検討を行った。FLJ00018 と FHL1B を共発現させた細胞においては、FHL1B が核と思われる構造に局在し細胞質に局在する FLJ00018 との共局在はあまり見られなかった。また、FHL1B と FLJ00018 に加え、G $\beta\gamma$ を共発現させたところ、細胞の広がりは見られるものの、FHL1B と FLJ00018 の局在にあまり変化は見られなかった (Fig. 4-10B)。一方、FHL1A と FLJ00018 の共発現させた細胞においては、FHL1A と FLJ00018 は、細胞質全体において共局在が見られ、細胞の広がりと神経突起様の構造の発達がみられた。また、FHL1A と FLJ00018 に加え、G $\beta\gamma$ を共発現させたところ、細胞の広がりと神経突起様の構造の発達の変化がより顕著にみられた (Fig. 4-10C)。しかしながら、細胞の広がりは、FLJ00018 と G $\beta\gamma$ を共発現させた細胞においても見られた (Fig. 4-10A)。これらの結果から、FLJ00018 は FHL1A と共に局在し、神経突起生成を含む細胞形態変化に寄与することが考えられる。



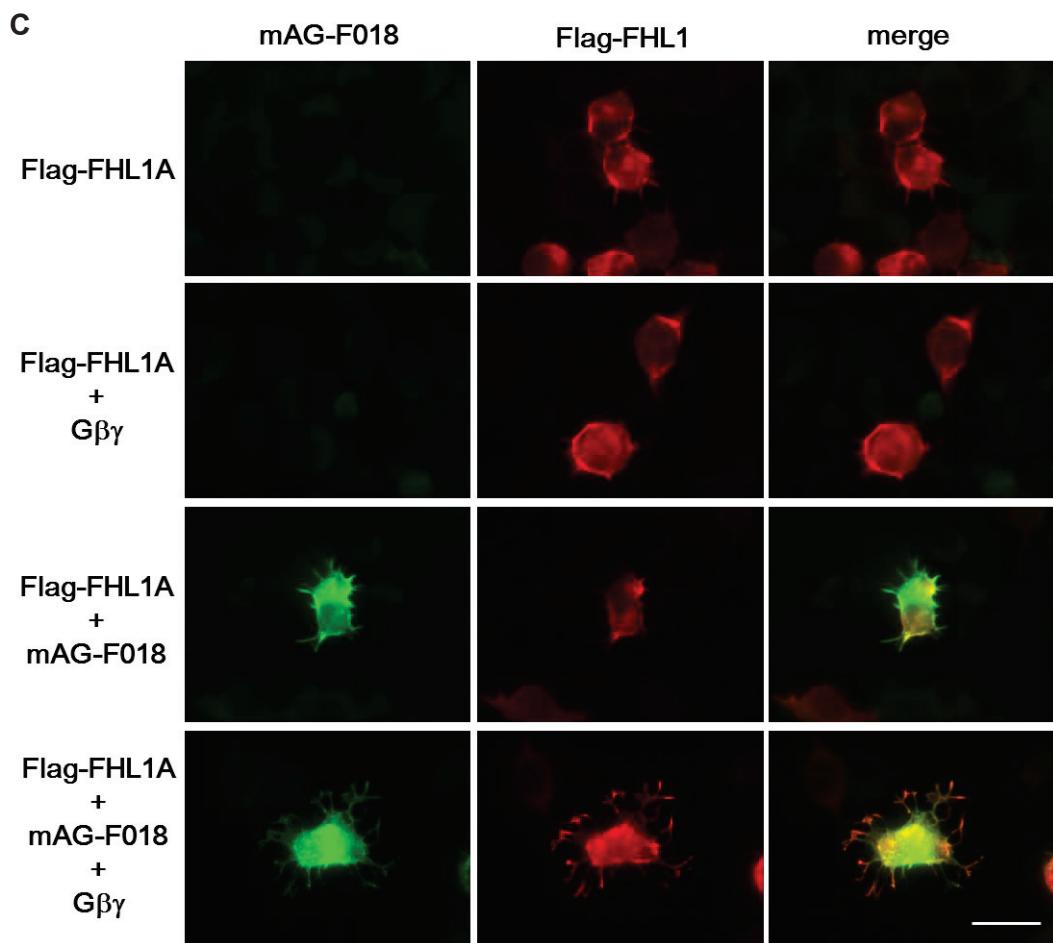
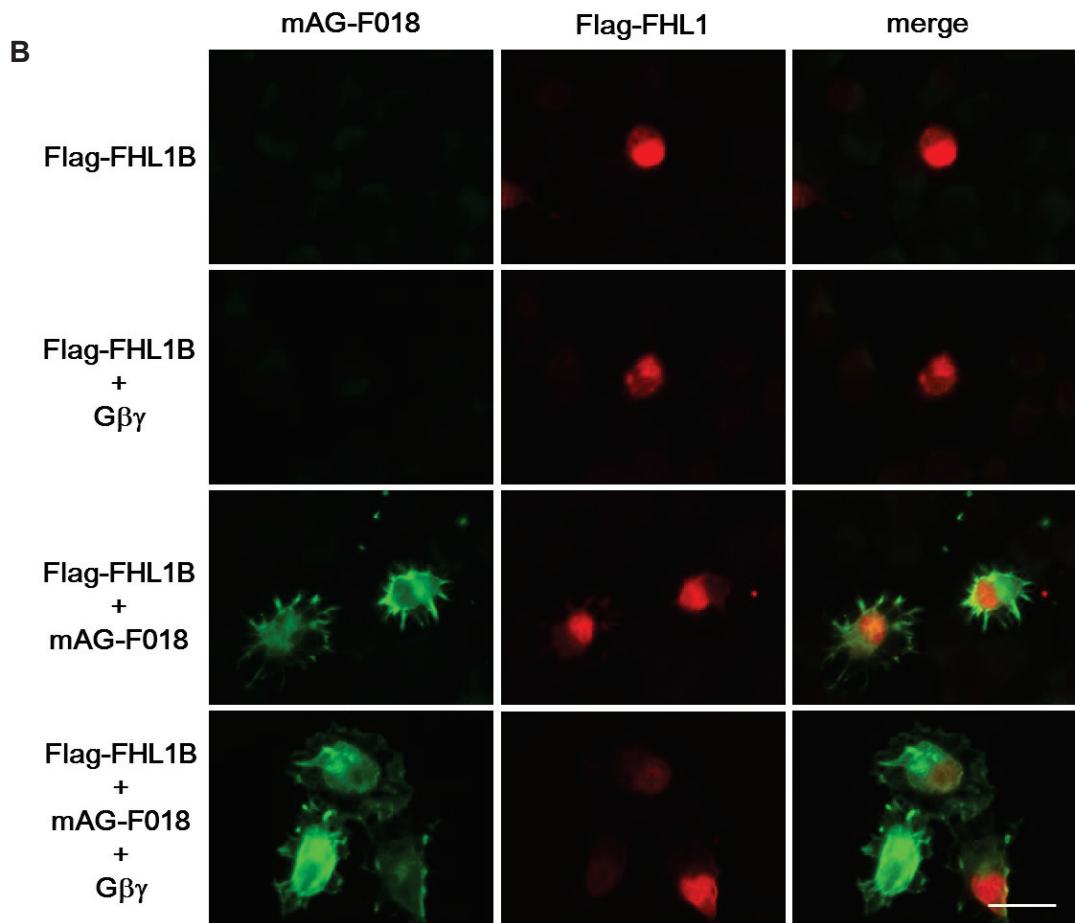


Fig. 4-10 FLJ00018 は FHL1A と共に局在する

A-C, Neuro-2a 細胞に、蛍光蛋白質 mAG を付加した FLJ00018 WT 及び Flag-タグを付加した FHL1A 及び FHL1B, G β , G γ の発現ベクターを図に示したように一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション後、細胞を固定し、Anti-Flag 抗体を用いて FHL1 を染色した。スケールバー, 40 μ m

第4節 考察

第3章において、FLJ00018の1-465番目のアミノ酸領域との相互作用する蛋白質を、酵母two-hybrid法を用いてスクリーニングした。得られた相互作用候補蛋白質の内、24クローンがGenbankデータベース上の遺伝子配列と高い相同性を示し(>80%)、その中から非筋細胞アクチンに着目し、相互作用の確認及び、相互作用が担う生理的役割について検討を行った。本章では、酵母two-hybrid法で得られた24クローンの内、非筋細胞アクチンとは別の蛋白質であるFHL1に着目し、相互作用の確認及び、相互作用が担う生理的役割について検討を行った。

FHL1は蛋白質間相互作用に関わるダブルZincフィンガーLIMドメインを4つもつ蛋白質である。two-hybridスクリーニングの結果よりFLJ00018との相互作用は、FHL1のN末端から数え、2番目のLIM及び3番目のLIMドメインが担っている可能性が示唆された。これは、FHL1のアイソフォームであるFHL1A, FHL1B及びFHL1Cの内、FHL1A及びFHL1Bと共通の配列を含んでいたことから、FHL1AおよびFHL1Bとの相互作用について検討したところ、両者のどちらとも相互作用したものの、FHL1Aとの相互作用の方が強いものと考えられた(Fig. 4-2B)。これは、FHL1Bが核にNLS配列を持ち、この配列により、主に核に局在する為であると考えられた(98)。このことは、細胞染色によるそれぞれの蛋白質の局在を調べた結果、FHL1Bとの共局在が弱かったことと一致している(Fig. 4-10B, C)。

FHL1Bは、細胞周期における間期の内、特に、G₂期において核外での局在が見られ、細胞質内及び核において蛋白質フォスファターゼ2Aの触媒サブユニットβ(PP2Ac_β)と相互作用することが報告されている(99)。このことから、FHL1Bが細胞周期の時期によって核と細胞質の両方に局在していることが考えられ、FLJ00018と弱い共沈が観察された一つの原因と考えられる。

FLJ00018は、N末端付近の58-150番目のアミノ酸配列においてFHL1Aと結合し、その相互作用がFLJ00018の活性上昇に寄与することが考えられた(Fig. 4-4, 4-5)。FLJ00018の1-465番目のアミノ酸領域におけるFHL1Aとの結合部位は、アクチンとの相互作用部位とは異なり、FLJ00018のDHドメインよりさらにN末端付近の配列がFLJ00018の活性化に重要な配列であることが示唆された。また、FLJ00018上のFHL1Aとの相互作用部位が、FLJ00018上のGβγとの相互作用部位と似ていることから、FLJ00018, FHL1A, Gβγの相互作用について検

討を行い、3 者が複合体を形成することも示唆された (Fig. 4-7)。このことから、FHL1A が FLJ00018 と G $\beta\gamma$ との結合を仲介する足場として働いている可能性も考えられた。また、SRE 活性上昇の結果と一致して、Neuro-2a 細胞内において、FLJ00018 と FHL1A の共発現によって、細胞の広がりと、神経突起様の構造の増加が見られた。この細胞の広がりと突起様構造の増加は、G $\beta\gamma$ との共発現によってさらに増強された。またこの時、突起の先端部において FLJ00018 と FHL1A の共局在がみられたことから、FHL1A が FLJ00018 と G $\beta\gamma$ との結合を仲介する足場として働くことに加え、FLJ00018 の機能発現のため、適切な局在への移行を助けている可能性が考えられた。

過去、FHL 蛋白質の ACT, FHL2, FHL3 が、アンドロゲン受容体 (AR) のコアクチベーターとして働くことが示された (100-102)。また、FHL2 が AR のコアクチベーターとして働く時、Rho の活性化が FHL2 の核への局在に重要な働きをしていると考えられている (103)。一方、FHL2 は、培養細胞内において、細胞接着斑での局在がみられることや、インテグリンと結合することも示唆されている (104,105)。また、FHL2 は、リン酸化された ERK2 と結合し、核内において、ELK-1, GATA4 の転写を抑制するという知見もある (106)。これらのことから、FHL 蛋白質は、様々な蛋白質と相互作用することで、核や細胞質の特定の場所に局在化し、結合する蛋白質の活性を特異的に制御していることが考えられる。これらの報告と本研究で得られた結果を合わせ考えると、FLJ00018 と FHL1 が相互作用することで、FLJ00018 の神経突起の成長円錐の細胞膜周辺への局在を留める、あるいは促進することにより、細胞膜上の G $\beta\gamma$ との相互作用を促進させ、細胞形態変化を引き起こしている可能性が考えられた。

前述のように、本研究で行った酵母 two-hybrid の prey 遺伝子が脳の cDNA 由来であること、また、FLJ00018 と FHL1 が脳において局在することを合わせ考えると、FLJ00018 は、神経ネットワーク形成にも寄与している可能性が示唆され、FLJ00018 の機能解析を進めることで、がんなどの病態解明に加え、神経発達過程や神経疾患の病態解明にも寄与できるかもしれないと考えられる。

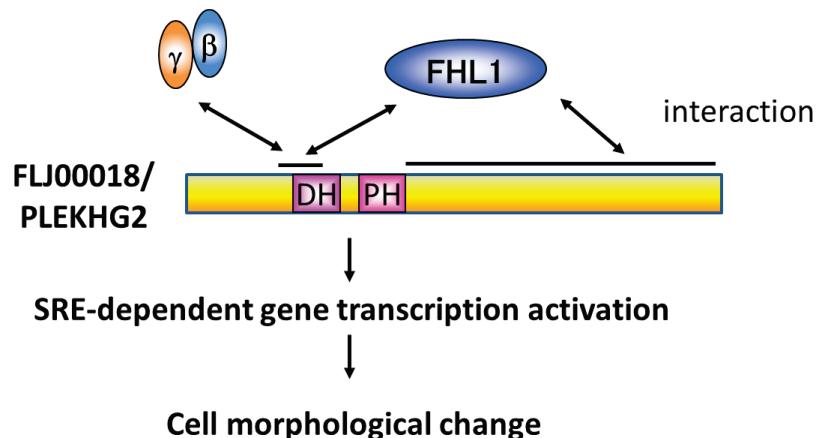


Fig. 4-11 FHL1 と FLJ00018 の相互作用及び活性化 本研究において、FLJ00018 は、FHL1 との相互作用により活性化され、突起伸長を含めた細胞形態変化に寄与することが明らかとなった。また、FHL1 と FLJ00018 及び G $\beta\gamma$ は三者複合体を形成する可能性が示唆された。

総括

がんは、現在の日本人の死因に占める割合が最も高く、その克服は特に重要な課題である。がんの多くは、遺伝子の変異が蓄積することで、引き起こされると考えられている。その中でも、細胞膜表面に存在する受容体の変異に由来する細胞外刺激の誤った受容と、細胞内へのシグナル変換の破綻や、細胞内シグナル伝達分子遺伝子変異による異常なシグナル伝達などが、がんの発症と密接に関わると考えられている。GPCR は細胞膜受容体の一種であり、その細胞内ドメインにおいて、 $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$ の 3 つのサブユニットで構成される、G 蛋白質と共に役している。GPCR は、三量体 G 蛋白質を介してシグナルを細胞内シグナルへと変換することにより、細胞の増殖、分化など様々な細胞応答に関与していることから、がんをはじめとする多くの疾患と関連し、薬剤のターゲットとして注目されている。一方、Ras や RhoA 等を含む単量体で働く Small GTPase も、細胞内シグナル交換器として働き、細胞増殖や形態変化調節などに関与している。特に、RhoGTPase は、アクチン細胞骨格制御に中心的な役割を果たすことで細胞形態変化に関与すると考えられており、近年、これらの変異ががんと密接に関わるという報告も見られる。RhoGTPase 活性化には、これらに特異的に働く RhoGEF が関わっている。近年、三量体 G 蛋白質シグナルによる RhoGTPase の活性化機構が明らかにされつつあり、これまでに $G\alpha$ や $G\beta\gamma$ によって直接活性化されるいくつかの RhoGEF が明らかにされてきた。 $G\beta\gamma$ により活性化される RhoGEF の一種である PLEKHG2/FLJ00018 は、RhoGTPase のなかでも、Rac1 と Cdc42 を活性化し、細胞伸展を制御することが明らかにされている。そこで、本研究では、FLJ00018 の $G\beta\gamma$ 以外による活性制御機構を検討し、以下に示す (1) と (2) について明らかにした。

(1) FLJ00018 のリン酸化による制御

FLJ00018 が G_s 共役型 GPCR である β_1 AR を介した EGFR の transactivation によるリン酸化を受け活性化されることが示唆された。また、FLJ00018 が EGFR の直接刺激によってもリノ酸化を受けて活性化されることが明らかとなった。さらに、FLJ00018 の各種欠損変異体及びアミノ酸置換変異体を用い検討を行ったところ、EGF 刺激により FLJ00018 の複数のアミノ酸残基がリノ酸化されることが明らかとなり、このうちひとつは、680 番目のスレオニン残基であ

ることが明らかとなった。さらに、この FLJ00018 のリン酸化が、細胞の突起状構造形成を含む細胞伸展に関与することも示唆された。以上のことから、FLJ00018 の EGF 刺激によるスレオニンリン酸化は、細胞増殖時の細胞形態制御機構に関与していると考えられた。

一方、他のいくつかの RhoGEF が、チロシンリン酸化により制御されることが知られていることから、細胞のがん化と密接に関わる非受容体型チロシンキナーゼの一種である Src による FLJ00018 のチロシンリン酸化についても検討を行い、FLJ00018 の 489 番目のチロシン残基が、Src シグナルによってリン酸化されることを明らかにした。また、リン酸化チロシン残基が、SH2 ドメインと相互作用することで蛋白質の機能調節に関与することが知られていることから、FLJ00018 のリン酸化チロシン残基と特異的に結合する蛋白質を同定する為、SH2 ドメインアレイを行い、PIK3R3 および ABL1 と特異的に相互作用する可能性を見出した。

(2) FLJ00018 と相互作用する蛋白質による制御

FLJ00018 と特異的に相互作用する蛋白質による活性制御について検討する為、DH ドメイン及び、PH ドメインを含む FLJ00018 の 1-465 番目のアミノ酸配列を bait、ヒト脳 cDNA を Prey とし、酵母 two-hybrid 法により解析した。その結果、FHL1、非筋細胞 β -、 γ -アクチンを含むいくつかの陽性クローンが得られた。また、今回、培養細胞内において FLJ00018 と β -、 γ -アクチン及び FHL1 との相互作用も明らかになった。さらに、 β -、 γ -アクチンは、FLJ00018 の DH ドメインを含む 150-283 aa 内に、FHL1 は、FLJ00018 の 58-150 aa 内に、それぞれ相互作用に必要な配列が存在することが示唆された。FHL1 及び、 β -、 γ -アクチンの FLJ00018 活性への影響について検討したところ、 β -、 γ -アクチンは抑制的に、FHL1 は促進的に働くことが明らかになった。今回明らかになった FHL1 相互作用領域と既知の G $\beta\gamma$ 相互作用領域に重なりがあることから、FLJ00018 の 58-150 aa の配列が活性化に重要な役割を担っていることが示唆された。

以上、本研究により、G $\beta\gamma$ シグナルに加え、FLJ00018 がリン酸化や蛋白質相互作用といった複数のシグナルにより活性制御を受け、細胞形態を調節することが明らかになった。GPCR は、様々な細胞応答に関与しており、創薬のターゲットとして注目されている。また、近年 GPCR

との関係が明らかにされつつある RhoGTPase も、その蛋白質が担う働きである、細胞形態変化を介し、がんや神経疾患と関わると考えられている。このことから、GPCR から RhoGTPase へのシグナル伝達を仲介する RhoGEF の機能解明がますます重要になると考えられる。本研究で着目した FLJ00018 も、ある種の lymphoma や神経疾患との関連が示唆されていることから、今後、他の蛋白質との相互作用に関わる構造解析などを含む FLJ00018 の活性化機構の詳細を解明することにより、FLJ00018 に関する細胞骨格再構築機構の破綻に伴うがんや神経疾患疾患の病態解明及び治療薬開発に役立つものと考えられる。

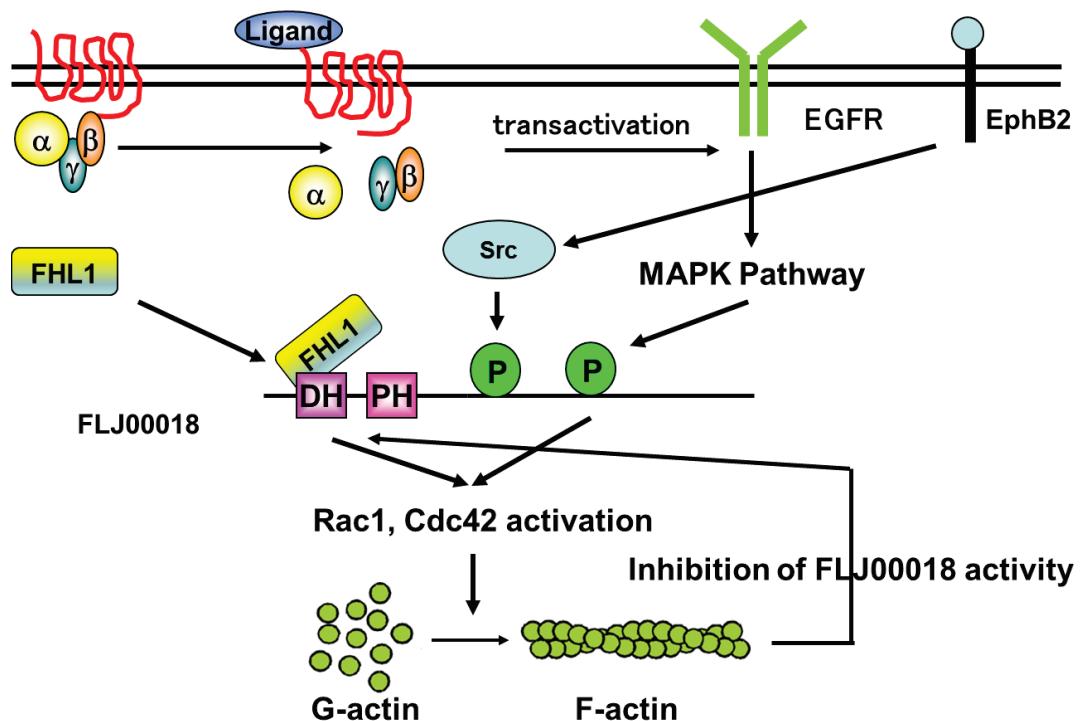


Fig. 1 本研究において提唱された FLJ00018 の活性制御機構

本研究において、過去の報告において示された、G $\beta\gamma$ による活性化に加え、FLJ00018 は、(1) EGFR シグナルを介した 680 番目のスレオニンリン酸化を介して活性化されることが明らかとなった。(2) EphB2/Src シグナルを介し 489 番目のチロシン残基がリン酸化され、PIK3R3 と特異的に結合することを見出した。(3) アクチンとの相互作用により、FLJ00018 の活性抑制を受けることが明らかとなった。(4) FHL1 との相互作用により、FLJ00018 が活性化され、突起伸長を含めた細胞形態変化に寄与することが明らかとなった。

謝辞

本研究遂行に際し、終始御懇篤なる御指導、御教鞭を賜りました岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 北出 幸夫 教授に深く感謝いたします。

本論文作成に際し、有益な御助言および御校閲を賜りました岐阜大学連合創薬医療情報研究科 赤尾 幸博 教授、丹羽 雅之 教授に深く感謝いたします。

本研究遂行に際し、多岐にわたる御指導および御助言を賜りました岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 上田 浩 准教授に深く感謝いたします。

また、共同研究をご快諾いただき、有益なる御助言および御指導を賜りましたかずさ DNA 研究所 長瀬 隆弘 博士および山口 佳洋 博士、岐阜大学医学部分子病態学講座 長岡 仁 教授、木村 正志 併任講師、岡野 幸雄 博士、岐阜薬科大学感染制御学研究室、杉山 剛志 准教授に心より感謝いたします。

本研究遂行に際し、いろいろとご協力を頂きました、岐阜大学連合創薬医療情報研究科、武藤 吉徳 教授、岐阜大学医学部分子病態学講座 黒川 良子 氏に感謝いたします。

本研究遂行に際し、いろいろとご協力を頂きました、岐阜大学工学部生命工学科生命情報工学第二講座の皆様に感謝いたします。

参考文献

1. Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., Majem, M., Lopez-Vivanco, G., Isla, D., Provencio, M., Insa, A., Massuti, B., Gonzalez-Larriba, J. L., Paz-Ares, L., Bover, I., Garcia-Campelo, R., Moreno, M. A., Catot, S., Rolfo, C., Reguart, N., Palmero, R., Sanchez, J. M., Bastus, R., Mayo, C., Bertran-Alamillo, J., Molina, M. A., Sanchez, J. J., and Taron, M. (2009) Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* **361**, 958-967
2. Cortes-Funes, H., Gomez, C., Rosell, R., Valero, P., Garcia-Giron, C., Velasco, A., Izquierdo, A., Diz, P., Camps, C., Castellanos, D., Alberola, V., Cardenal, F., Gonzalez-Larriba, J. L., Vieitez, J. M., Maeztu, I., Sanchez, J. J., Queralt, C., Mayo, C., Mendez, P., Moran, T., and Taron, M. (2005) Epidermal growth factor receptor activating mutations in Spanish gefitinib-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* **16**, 1081-1086
3. Tokumo, M., Toyooka, S., Kiura, K., Shigematsu, H., Tomii, K., Aoe, M., Ichimura, K., Tsuda, T., Yano, M., Tsukuda, K., Tabata, M., Ueoka, H., Tanimoto, M., Date, H., Gazdar, A. F., and Shimizu, N. (2005) The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* **11**, 1167-1173
4. Dorsam, R. T., and Gutkind, J. S. (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 79-94
5. Lappano, R., and Maggiolini, M. (2011) G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 47-60
6. Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., and Bos, J. L. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**, 525-532
7. Kawazu, M., Ueno, T., Kontani, K., Ogita, Y., Ando, M., Fukumura, K., Yamato, A., Soda, M., Takeuchi, K., Miki, Y., Yamaguchi, H., Yasuda, T., Naoe, T., Yamashita, Y., Katada, T., Choi, Y. L., and Mano, H. (2013) Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 3029-3034
8. Bustelo, X. R., Sauzeau, V., and Berenjeno, I. M. (2007) GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* **29**, 356-370
9. Hall, A. (1998) Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514
10. Aittaleb, M., Boguth, C. A., and Tesmer, J. J. (2010) Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors. *Mol Pharmacol* **77**, 111-125
11. Rossman, K. L., Der, C. J., and Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 167-180
12. Zheng, Y. (2001) Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci* **26**, 724-732
13. Meller, N., Merlot, S., and Guda, C. (2005) CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *J Cell Sci* **118**, 4937-4946

14. Fukuhara, S., Murga, C., Zohar, M., Igishi, T., and Gutkind, J. S. (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem* **274**, 5868-5879
15. Fukuhara, S., Chikumi, H., and Gutkind, J. S. (2000) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G(12) family to Rho. *FEBS Lett* **485**, 183-188
16. Hart, M. J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W. D., Gilman, A. G., Sternweis, P. C., and Bollag, G. (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galphai3. *Science* **280**, 2112-2114
17. Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rumenapp, U., Jakobs, K. H., Schmidt, M., and Wieland, T. (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem* **280**, 11134-11139
18. Skowronek, K. R., Guo, F., Zheng, Y., and Nassar, N. (2004) The C-terminal basic tail of RhoG assists the guanine nucleotide exchange factor trio in binding to phospholipids. *J Biol Chem* **279**, 37895-37907
19. Bateman, J., and Van Vactor, D. (2001) The Trio family of guanine-nucleotide-exchange factors: regulators of axon guidance. *J Cell Sci* **114**, 1973-1980
20. Welch, H. C., Coadwell, W. J., Ellson, C. D., Ferguson, G. J., Andrews, S. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P. T., and Stephens, L. R. (2002) P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* **108**, 809-821
21. Sosa, M. S., Lopez-Haber, C., Yang, C., Wang, H., Lemmon, M. A., Busillo, J. M., Luo, J., Benovic, J. L., Klein-Szanto, A., Yagi, H., Gutkind, J. S., Parsons, R. E., and Kazanietz, M. G. (2010) Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Mol Cell* **40**, 877-892
22. Himmel, K. L., Bi, F., Shen, H., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Zheng, Y., and Largaespada, D. A. (2002) Activation of clg, a novel dbl family guanine nucleotide exchange factor gene, by proviral insertion at evi24, a common integration site in B cell and myeloid leukemias. *J Biol Chem* **277**, 13463-13472
23. Ueda, H., Nagae, R., Kozawa, M., Morishita, R., Kimura, S., Nagase, T., Ohara, O., Yoshida, S., and Asano, T. (2008) Heterotrimeric G protein betagamma subunits stimulate FLJ00018, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem* **283**, 1946-1953
24. Runne, C., and Chen, S. (2013) PLEKHG2 promotes heterotrimeric G protein betagamma-stimulated lymphocyte migration via Rac and Cdc42 activation and actin polymerization. *Mol Cell Biol* **33**, 4294-4307
25. Yamada, T., Ohoka, Y., Kogo, M., and Inagaki, S. (2005) Physical and functional interactions of the lysophosphatidic acid receptors with PDZ domain-containing Rho guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs). *J Biol Chem* **280**, 19358-19363
26. Chikumi, H., Vazquez-Prado, J., Servitja, J. M., Miyazaki, H., and Gutkind, J. S. (2002)

- Potent activation of RhoA by Galpho q and Gq-coupled receptors. *J Biol Chem* **277**, 27130-27134
27. Schiller, M. R. (2006) Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases--GEFs what's the link. *Cell Signal* **18**, 1834-1843
28. Itoh, R. E., Kiyokawa, E., Aoki, K., Nishioka, T., Akiyama, T., and Matsuda, M. (2008) Phosphorylation and activation of the Rac1 and Cdc42 GEF Asef in A431 cells stimulated by EGF. *J Cell Sci* **121**, 2635-2642
29. Shin, E. Y., Shin, K. S., Lee, C. S., Woo, K. N., Quan, S. H., Soung, N. K., Kim, Y. G., Cha, C. I., Kim, S. R., Park, D., Bokoch, G. M., and Kim, E. G. (2002) Phosphorylation of p85 beta PIX, a Rac/Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor, via the Ras/ERK/PAK2 pathway is required for basic fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem* **277**, 44417-44430
30. Aittaleb, M., Nishimura, A., Linder, M. E., and Tesmer, J. J. (2011) Plasma membrane association of p63 Rho guanine nucleotide exchange factor (p63RhoGEF) is mediated by palmitoylation and is required for basal activity in cells. *J Biol Chem* **286**, 34448-34456
31. Nakajima, D., Okazaki, N., Yamakawa, H., Kikuno, R., Ohara, O., and Nagase, T. (2002) Construction of expression-ready cDNA clones for KIAA genes: manual curation of 330 KIAA cDNA clones. *DNA Res* **9**, 99-106
32. Karasawa, S., Araki, T., Yamamoto-Hino, M., and Miyawaki, A. (2003) A green-emitting fluorescent protein from Galaxeidae coral and its monomeric version for use in fluorescent labeling. *J Biol Chem* **278**, 34167-34171
33. Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K., and Koike, T. (2006) Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics* **5**, 749-757
34. Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. (2009) Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat Protoc* **4**, 1513-1521
35. Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Ujihara, H., and Koike, T. (2009) Mobility shift detection of phosphorylation on large proteins using a Phos-tag SDS-PAGE gel strengthened with agarose. *Proteomics* **9**, 4098-4101
36. Hill, C. S., Wynne, J., and Treisman, R. (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**, 1159-1170
37. Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402**, 884-888
38. Maudsley, S., Pierce, K. L., Zamah, A. M., Miller, W. E., Ahn, S., Daaka, Y., Lefkowitz, R. J., and Luttrell, L. M. (2000) The beta(2)-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **275**, 9572-9580
39. Yano, N., Ianus, V., Zhao, T. C., Tseng, A., Padbury, J. F., and Tseng, Y. T. (2007) A novel signaling pathway for beta-adrenergic receptor-mediated activation of phosphoinositide

- 3-kinase in H9c2 cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H385-393
40. Noma, T., Lemaire, A., Naga Prasad, S. V., Barki-Harrington, L., Tilley, D. G., Chen, J., Le Corvoisier, P., Violin, J. D., Wei, H., Lefkowitz, R. J., and Rockman, H. A. (2007) Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J Clin Invest* **117**, 2445-2458
41. Kim, J., Eckhart, A. D., Eguchi, S., and Koch, W. J. (2002) Beta-adrenergic receptor-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblasts is dependent on transactivation of the epidermal growth factor receptor and subsequent activation of extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* **277**, 32116-32123
42. Tilley, D. G., Kim, I. M., Patel, P. A., Violin, J. D., and Rockman, H. A. (2009) beta-Arrestin mediates beta1-adrenergic receptor-epidermal growth factor receptor interaction and downstream signaling. *J Biol Chem* **284**, 20375-20386
43. Fleming, I. N., Elliott, C. M., Collard, J. G., and Exton, J. H. (1997) Lysophosphatidic acid induces threonine phosphorylation of Tiam1 in Swiss 3T3 fibroblasts via activation of protein kinase C. *J Biol Chem* **272**, 33105-33110
44. Sheridan, D. L., Kong, Y., Parker, S. A., Dalby, K. N., and Turk, B. E. (2008) Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *J Biol Chem* **283**, 19511-19520
45. Zhang, Y., Sawada, T., Jing, X., Yokote, H., Yan, X., and Sakaguchi, K. (2007) Regulation of ephexin1, a guanine nucleotide exchange factor of Rho family GTPases, by fibroblast growth factor receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **282**, 31103-31112
46. Drube, S., Stirnweiss, J., Valkova, C., and Liebmann, C. (2006) Ligand-independent and EGF receptor-supported transactivation: lessons from beta2-adrenergic receptor signalling. *Cell Signal* **18**, 1633-1646
47. Liebmann, C. (2011) EGF receptor activation by GPCRs: an universal pathway reveals different versions. *Mol Cell Endocrinol* **331**, 222-231
48. Daaka, Y., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**, 88-91
49. Friedman, J., Babu, B., and Clark, R. B. (2002) Beta(2)-adrenergic receptor lacking the cyclic AMP-dependent protein kinase consensus sites fully activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 in human embryonic kidney 293 cells: lack of evidence for G(s)/G(i) switching. *Mol Pharmacol* **62**, 1094-1102
50. Wang, D., Paria, B. C., Zhang, Q., Karpurapu, M., Li, Q., Gerthoffer, W. T., Nakaoka, Y., and Rao, G. N. (2009) A role for Gab1/SHP2 in thrombin activation of PAK1: gene transfer of kinase-dead PAK1 inhibits injury-induced restenosis. *Circ Res* **104**, 1066-1075
51. Feng, Q., Baird, D., Peng, X., Wang, J., Ly, T., Guan, J. L., and Cerione, R. A. (2006) Cool-1 functions as an essential regulatory node for EGF receptor- and Src-mediated cell growth. *Nat Cell Biol* **8**, 945-956
52. Fujishiro, S. H., Tanimura, S., Mure, S., Kashimoto, Y., Watanabe, K., and Kohno, M. (2008)

- ERK1/2 phosphorylate GEF-H1 to enhance its guanine nucleotide exchange activity toward RhoA. *Biochem Biophys Res Commun* **368**, 162-167
53. Shirazi Fard, S., Kele, J., Vilar, M., Paratcha, G., and Ledda, F. (2010) Tiam1 as a signaling mediator of nerve growth factor-dependent neurite outgrowth. *PLoS One* **5**, e9647
54. Samson, T., Welch, C., Monaghan-Benson, E., Hahn, K. M., and Burridge, K. (2010) Endogenous RhoG is rapidly activated after epidermal growth factor stimulation through multiple guanine-nucleotide exchange factors. *Mol Biol Cell* **21**, 1629-1642
55. Estrach, S., Schmidt, S., Diriong, S., Penna, A., Blangy, A., Fort, P., and Debant, A. (2002) The Human Rho-GEF trio and its target GTPase RhoG are involved in the NGF pathway, leading to neurite outgrowth. *Curr Biol* **12**, 307-312
56. Sood, A. K., Coffin, J. E., Schneider, G. B., Fletcher, M. S., DeYoung, B. R., Gruman, L. M., Gershenson, D. M., Schaller, M. D., and Hendrix, M. J. C. (2004) Biological Significance of Focal Adhesion Kinase in Ovarian Cancer. *The American Journal of Pathology* **165**, 1087-1095
57. Kornberg, L. J. (1998) Focal adhesion kinase expression in oral cancers. *Head Neck* **20**, 634-639
58. Cance, W. G., Harris, J. E., Iacocca, M. V., Roche, E., Yang, X., Chang, J., Simkins, S., and Xu, L. (2000) Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res* **6**, 2417-2423
59. Lark, A. L., Livasy, C. A., Calvo, B., Caskey, L., Moore, D. T., Yang, X., and Cance, W. G. (2003) Overexpression of focal adhesion kinase in primary colorectal carcinomas and colorectal liver metastases: immunohistochemistry and real-time PCR analyses. *Clin Cancer Res* **9**, 215-222
60. Itoh, S., Maeda, T., Shimada, M., Aishima, S., Shirabe, K., Tanaka, S., and Maehara, Y. (2004) Role of expression of focal adhesion kinase in progression of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**, 2812-2817
61. Carelli, S., Zadra, G., Vaira, V., Falleni, M., Bottiglieri, L., Nosotti, M., Di Giulio, A. M., Gorio, A., and Bosari, S. (2006) Up-regulation of focal adhesion kinase in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **53**, 263-271
62. Miyazaki, T., Kato, H., Nakajima, M., Sohda, M., Fukai, Y., Masuda, N., Manda, R., Fukuchi, M., Tsukada, K., and Kuwano, H. (2003) FAK overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* **89**, 140-145
63. Liu, B. A., Engelmann, B. W., and Nash, P. D. (2012) The language of SH2 domain interactions defines phosphotyrosine-mediated signal transduction. *FEBS Lett* **586**, 2597-2605
64. Ingle, E. (2008) Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 56-65
65. Roskoski, R., Jr. (2005) Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation.

66. Roskoski, R., Jr. (2004) Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **324**, 1155-1164
67. Woodcock, S. A., Rooney, C., Lontos, M., Connolly, Y., Zoumpourlis, V., Whetton, A. D., Gorgoulis, V. G., and Malliri, A. (2009) SRC-induced disassembly of adherens junctions requires localized phosphorylation and degradation of the rac activator tiam1. *Mol Cell* **33**, 639-653
68. Kawakatsu, T., Ogita, H., Fukuhara, T., Fukuyama, T., Minami, Y., Shimizu, K., and Takai, Y. (2005) Vav2 as a Rac-GDP/GTP exchange factor responsible for the nectin-induced, c-Src- and Cdc42-mediated activation of Rac. *J Biol Chem* **280**, 4940-4947
69. Pawson, T., Gish, G. D., and Nash, P. (2001) SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol* **11**, 504-511
70. Yaffe, M. B. (2002) Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 177-186
71. Furstoss, O., Dorey, K., Simon, V., Barila, D., Superti-Furga, G., and Roche, S. (2002) c-Abl is an effector of Src for growth factor-induced c-myc expression and DNA synthesis. *EMBO J* **21**, 514-524
72. Plattner, R., Kadlec, L., DeMali, K. A., Kazlauskas, A., and Pendergast, A. M. (1999) c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev* **13**, 2400-2411
73. Teramoto, H., Salem, P., Robbins, K. C., Bustelo, X. R., and Gutkind, J. S. (1997) Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product links FcepsilonRI to the Rac1-JNK pathway. *J Biol Chem* **272**, 10751-10755
74. Matsuguchi, T., Inhorn, R. C., Carlesso, N., Xu, G., Druker, B., and Griffin, J. D. (1995) Tyrosine phosphorylation of p95Vav in myeloid cells is regulated by GM-CSF, IL-3 and steel factor and is constitutively increased by p210BCR/ABL. *EMBO J* **14**, 257-265
75. Sini, P., Cannas, A., Koleske, A. J., Di Fiore, P. P., and Scita, G. (2004) Abl-dependent tyrosine phosphorylation of Sos-1 mediates growth-factor-induced Rac activation. *Nat Cell Biol* **6**, 268-274
76. Zisch, A. H., Kalo, M. S., Chong, L. D., and Pasquale, E. B. (1998) Complex formation between EphB2 and Src requires phosphorylation of tyrosine 611 in the EphB2 juxtamembrane region. *Oncogene* **16**, 2657-2670
77. Lazer, G., Pe'er, L., Farago, M., Machida, K., Mayer, B. J., and Katzav, S. (2010) Tyrosine residues at the carboxyl terminus of Vav1 play an important role in regulation of its biological activity. *J Biol Chem* **285**, 23075-23085
78. Swiercz, J. M., Kuner, R., Behrens, J., and Offermanns, S. (2002) Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. *Neuron* **35**, 51-63
79. Driessens, M. H., Olivo, C., Nagata, K., Inagaki, M., and Collard, J. G. (2002) B plexins activate Rho through PDZ-RhoGEF. *FEBS Lett* **529**, 168-172

80. Perrot, V., Vazquez-Prado, J., and Gutkind, J. S. (2002) Plexin B regulates Rho through the guanine nucleotide exchange factors leukemia-associated Rho GEF (LARG) and PDZ-RhoGEF. *J Biol Chem* **277**, 43115-43120
81. Aurandt, J., Vikis, H. G., Gutkind, J. S., Ahn, N., and Guan, K. L. (2002) The semaphorin receptor plexin-B1 signals through a direct interaction with the Rho-specific nucleotide exchange factor, LARG. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 12085-12090
82. Hirotani, M., Ohoka, Y., Yamamoto, T., Nirasawa, H., Furuyama, T., Kogo, M., Matsuya, T., and Inagaki, S. (2002) Interaction of plexin-B1 with PDZ domain-containing Rho guanine nucleotide exchange factors. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 32-37
83. Garcia-Mata, R., Wennerberg, K., Arthur, W. T., Noren, N. K., Ellerbroek, S. M., and Burridge, K. (2006) Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates. *Methods Enzymol* **406**, 425-437
84. Dugina, V., Zwaenepoel, I., Gabbiani, G., Clement, S., and Chaponnier, C. (2009) Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *J Cell Sci* **122**, 2980-2988
85. Brockmann, C., Huarte, J., Dugina, V., Challet, L., Rey, E., Conne, B., Swetloff, A., Nef, S., Chaponnier, C., and Vassalli, J. D. (2011) Beta- and gamma-cytoplasmic actins are required for meiosis in mouse oocytes. *Biol Reprod* **85**, 1025-1039
86. Lee, C. S., Choi, C. K., Shin, E. Y., Schwartz, M. A., and Kim, E. G. (2010) Myosin II directly binds and inhibits Dbl family guanine nucleotide exchange factors: a possible link to Rho family GTPases. *J Cell Biol* **190**, 663-674
87. Lee, S. J., Yang, S. J., Kim, D. H., Pak, J. H., Lee, K. H., Choi, K. H., Park, D., and Rhee, S. (2011) Interaction of microtubules and actin with the N-terminus of betaPix-b(L) directs cellular pinocytosis. *Mol Cell Biochem* **351**, 207-215
88. Banerjee, J., and Wedegaertner, P. B. (2004) Identification of a novel sequence in PDZ-RhoGEF that mediates interaction with the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **15**, 1760-1775
89. Banerjee, J., Fischer, C. C., and Wedegaertner, P. B. (2009) The amino acid motif L/IxxFE defines a novel actin-binding sequence in PDZ-RhoGEF. *Biochemistry* **48**, 8032-8043
90. Schoser, B., Goebel, H. H., Janisch, I., Quasthoff, S., Rother, J., Bergmann, M., Muller-Felber, W., and Windpassinger, C. (2009) Consequences of mutations within the C terminus of the FHL1 gene. *Neurology* **73**, 543-551
91. Selcen, D., Bromberg, M. B., Chin, S. S., and Engel, A. G. (2011) Reducing bodies and myofibrillar myopathy features in FHL1 muscular dystrophy. *Neurology* **77**, 1951-1959
92. McGrath, M. J., Cottle, D. L., Nguyen, M. A., Dyson, J. M., Coghill, I. D., Robinson, P. A., Holdsworth, M., Cowling, B. S., Hardeman, E. C., Mitchell, C. A., and Brown, S. (2006) Four and a half LIM protein 1 binds myosin-binding protein C and regulates myosin filament formation and sarcomere assembly. *J Biol Chem* **281**, 7666-7683
93. Coghill, I. D., Brown, S., Cottle, D. L., McGrath, M. J., Robinson, P. A., Nandurkar, H. H., Dyson, J. M., and Mitchell, C. A. (2003) FHL3 is an actin-binding protein that regulates

- alpha-actinin-mediated actin bundling: FHL3 localizes to actin stress fibers and enhances cell spreading and stress fiber disassembly. *J Biol Chem* **278**, 24139-24152
94. Lee, S. M., Li, H. Y., Ng, E. K., Or, S. M., Chan, K. K., Kotaka, M., Chim, S. S., Tsui, S. K., Waye, M. M., Fung, K. P., and Lee, C. Y. (1999) Characterization of a brain-specific nuclear LIM domain protein (FHL1B) which is an alternatively spliced variant of FHL1. *Gene* **237**, 253-263
 95. Kudo, L. C., Karsten, S. L., Chen, J., Levitt, P., and Geschwind, D. H. (2007) Genetic analysis of anterior posterior expression gradients in the developing mammalian forebrain. *Cereb Cortex* **17**, 2108-2122
 96. Shen, Y., Jia, Z., Nagele, R. G., Ichikawa, H., and Goldberg, G. S. (2006) SRC uses Cas to suppress Fhl1 in order to promote nonanchored growth and migration of tumor cells. *Cancer Res* **66**, 1543-1552
 97. Kadomas, J. L., and Beckerle, M. C. (2004) The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 920-931
 98. Brown, S., McGrath, M. J., Ooms, L. M., Gurung, R., Maimone, M. M., and Mitchell, C. A. (1999) Characterization of two isoforms of the skeletal muscle LIM protein 1, SLIM1. Localization of SLIM1 at focal adhesions and the isoform slimmer in the nucleus of myoblasts and cytoplasm of myotubes suggests distinct roles in the cytoskeleton and in nuclear-cytoplasmic communication. *J Biol Chem* **274**, 27083-27091
 99. Wong, C. H., Fung, Y. W., Ng, E. K., Lee, S. M., Waye, M. M., and Tsui, S. K. (2010) LIM domain protein FHL1B interacts with PP2A catalytic beta subunit--a novel cell cycle regulatory pathway. *FEBS Lett* **584**, 4511-4516
 100. Fimia, G. M., De Cesare, D., and Sassone-Corsi, P. (1999) CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. *Nature* **398**, 165-169
 101. Fimia, G. M., De Cesare, D., and Sassone-Corsi, P. (2000) A family of LIM-only transcriptional coactivators: tissue-specific expression and selective activation of CREB and CREM. *Mol Cell Biol* **20**, 8613-8622
 102. Muller, J. M., Isele, U., Metzger, E., Rempel, A., Moser, M., Pscherer, A., Breyer, T., Holubarsch, C., Buettner, R., and Schule, R. (2000) FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J* **19**, 359-369
 103. Muller, J. M., Metzger, E., Greschik, H., Bosserhoff, A. K., Mercep, L., Buettner, R., and Schule, R. (2002) The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus. *EMBO J* **21**, 736-748
 104. Wixler, V., Geerts, D., Laplantine, E., Westhoff, D., Smyth, N., Aumailley, M., Sonnenberg, A., and Paulsson, M. (2000) The LIM-only protein DRAL/FHL2 binds to the cytoplasmic domain of several alpha and beta integrin chains and is recruited to adhesion complexes. *J Biol Chem* **275**, 33669-33678
 105. Li, H. Y., Kotaka, M., Kostin, S., Lee, S. M., Kok, L. D., Chan, K. K., Tsui, S. K., Schaper, J., Zimmermann, R., Lee, C. Y., Fung, K. P., and Waye, M. M. (2001) Translocation of a human

- focal adhesion LIM-only protein, FHL2, during myofibrillogenesis and identification of LIM2 as the principal determinants of FHL2 focal adhesion localization. *Cell Motil Cytoskeleton* **48**, 11-23
106. Purcell, N. H., Darwis, D., Bueno, O. F., Muller, J. M., Schule, R., and Molkentin, J. D. (2004) Extracellular signal-regulated kinase 2 interacts with and is negatively regulated by the LIM-only protein FHL2 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* **24**, 1081-1095

略語一覧表

ABL1	Abelson tyrosine kinase
APC	Adenomatous polyposis coli
AR	Androgen receptor
BCA	Bovine serum albumin
Cas	Crk-associated substrate
CaMK II	Calmodulin-Dependent Protein Kinase II
cDNA	Complementary DNA
CS	Calf serum
CZH	CDM-zizimin homology
DH domain	Dbl homology domain
DHR2	Dock homology region 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Eph	Ephrin receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FHL1	Four and a half LIM domain 1
GAP	GTPase activation protein
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GPCR	heterotrimeric G-protein coupled receptor

G-protein	Guanosine triphosphate-binding protein
GTP	Guanosine triphosphate
HB-EGF	Heparin-binding EGF
HGFR	Hepatocyte growth factor receptor
HRP	Horseradish peroxidase
IGFR	Insulin-like growth factor receptor
LARG	leukemia-associated RhoGEF
LPA	Lysophosphatidic acid
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MEK	MAP kinase kinase
NLS	Nuclear localization signal
ORF	Open reading frame
PAR1	Protease-activated receptors 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDZ domain	PSD-95/Dlg/Zo-1 domain
PH domain	Pleckstrin homology domain
PIK3	Phosphatidylinositol-3 kinase
PIK3R3	Phosphatidylinositol-3 kinase regulatory subunit3
PLC γ 1	Phospholipase C γ 1
PLEKHG2	pleckstrin homology domain containing, family G
PP2Ac β	Protein phosphatase 2A catalytic subunit C β
RGS domain	Regulator of G-protein signaling domain
RhoGEF	Rho family specific GEF
RhoGTPase	Rho family specific small GTPase

RTK	Receptor tyrosine kinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SH2	Src homology 2
SRE	Serum response element
TBS	Tris buffered saline
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
β_1 AR	β_1 -Adrenergic receptor
β -ARKct	C-terminal of β -adrenergic receptor kinase

論文目録

本学位論文は、以下の発表論文を総括したものである。

1. Katsuya Sato, Hiroaki Handa, Masashi Kimura, Yukio Okano, Hitoshi Nagaoka, Takahiro Nagase, Tsuyoshi Sugiyama, Yukio Kitade, and Hiroshi Ueda (2013) Identification of a Rho family specific guanine nucleotide exchange factor, FLJ00018, as a novel actin-binding protein. *Cellular Signalling* **25**, 41-49
2. Katsuya Sato, Takahiro Suzuki, Yoshihiro Yamaguchi, Yukio Kitade, Takahiro Nagase, and Hiroshi Ueda (2014) PLEKHG2/FLJ00018, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, is tyrosine phosphorylated via the EphB2/cSrc signaling pathway. *Cellular Signalling* **26**, 691-696
3. Katsuya Sato, Tsuyoshi Sugiyama, Takahiro Nagase, Yukio Kitade, and Hiroshi Ueda, Threonine 680 phosphorylation of FLJ00018/PLEKHG2, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, by epidermal growth factor receptor signaling regulates cell morphology of Neuro-2a cells. *Journal of Biological Chemistry*, *in press*