



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

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

氏名（本籍）	佐藤 克哉 (愛知県)
学位の種類	博士 (薬科学)
学位授与番号	甲第 24 号
学位授与日付	平成 26 年 3 月 25 日
専攻	創薬科学専攻
学位論文題目	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)
学位論文審査委員	(主査) 教授 赤尾 幸博 (副査) 教授 丹羽 雅之 (副査) 准教授 上田 浩 (副査) 教授 北出 幸夫

論文内容の要旨

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 蛋白質は、 $G\alpha$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ の 3 つのサブユニットで構成され、三量体 G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) シグナル交換器として働くことで細胞の増殖、分化など様々な細胞応答に関与している。GPCR シグナルは、癌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低分子量 G 蛋白質も、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。Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 (Rho) は、アクチン細胞骨格制御に中心的な役割を果たすと考えられている。Rho 活性化には、これらに特異的に働くグアニンヌクレオチド交換因子 (RhoGEF) が関わっている。近年、三量体 G 蛋白質シグナルによる Rho 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 FLJ00018/PLEKHG2 (F018) は、Rho の 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、F018 の $G\beta\gamma$ 以外による制御機構を同定し、その細胞機能を明らかにすることを試みた。

(1) F018 のリン酸化による制御

F018 と Gs 共役型 GPCR である $\beta 1$ アドレナリン受容体 ($\beta 1AR$) を共発現させた NIH3T3 細胞の解析により、F018 が、 $\beta 1AR$ を介した上皮増殖因子 (EGF) 受容体 (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、F018 が EGFR の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明らかとなった。さらに、F018 の種々の変異体を用い検討を行ったところ、EGF 刺激により F018 の複数のアミノ酸残基がリン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 F018 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、F018 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ことが考えられた。

一方、Asef を含むいくつかの 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。

そこで、細胞の癌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 F018 のチロシンリン酸化について検討を行った。Src の恒常的活性化型変異体 (SrcCA) との共発現により、F018 がチロシンリン酸化されることが明らかになった。さらに、F018 の種々の変異体を用いることにより、F018 の 489 番目のチロシンが Src によりリン酸化されることが明らかとなった。一般的に、リン酸化チロシンが、Src homology (SH) 2 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。そこで、F018 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、Phosphoinositide 3 kinase regulatory subunit 3 (PI3KR3) および Abelson tyrosine kinase 1 (ABL1) と特異的に相互作用する可能性を見出した。今後、これらの相互作用の細胞機能について検討する必要があると考えられた。

(2) F018 と相互作用する蛋白質による制御

F018 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、Dbl homology (DH) ドメイン及び、pleckstrin homology (PH) ドメインを含む F018 の 1-465 アミノ酸配列 (aa) 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、Four and a half LIM domain 含有蛋白質 (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。さらに、培養細胞内において F018 と β -、 γ -アクチン及び FHL1 の全長との相互作用も明らかになった。また、F018 の各種変異体を用いた解析により、 β -、 γ -アクチンは、F018 の DH ドメインを含む 150-283 aa 内に、FHL1 は、F018 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。さらに、FHL1 及び、 β -、 γ -アクチンの F018 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 β γ 相互作用領域に重なりがあることから、F018 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。

本研究により、G β γ に加え、F018 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。F018 がある種の lymphoma や神経疾患との関連が示唆されていることから、今後、さらに F018 の構造の詳細などを検討することにより、それらの疾患も含め、F018 に関係する細胞骨格再構築機構の破綻に伴う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。

論文審査結果の要旨

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 蛋白質は、G α 、G β 、G γ の 3 つのサブユニットで構成され、三量体 G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) シグナル交換器として働くことで細胞の増殖、分化など様々な細胞応答に関与している。GPCR シグナルは、癌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低分子量 G 蛋白質も、細胞内交換器として働き、細胞増殖や形態変化調節などに関与している。Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 (Rho) は、アクチン細胞骨格制御に中心的な役割を果たすと考えられている。Rho 活性化には、これらに特異的に働くグアニンヌクレオチド交換因子 (RhoGEF) が関わっている。近年、三量体 G 蛋白質シグナルによる Rho の活性化機構が明らかにされつつあり、これまでに G α や G β γ 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 β γ により活性化される RhoGEF の一種である

FLJ00018/PLEKHG2 (F018)は、Rho の 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、申請者は、F018 の G β γ 以外による制御機構を同定し、その細胞機能を明らかにすることを試み、その詳細を以下の二つの観点から報告している。

(1) F018 のリン酸化による制御

F018 と Gs 共役型 GPCR である β 1 アドレナリン受容体 (β 1AR) を共発現させた NIH3T3 細胞の解析により、F018 が、 β 1AR を介した上皮増殖因子 (EGF) 受容体 (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、F018 が EGFR の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明らかとなった。さらに、F018 の種々の変異体を用い検討を行ったところ、EGF 刺激により F018 の複数のアミノ酸残基がリン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 F018 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、F018 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ことが考えられた。

一方、Asef を含むいくつかの 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。そこで、細胞の癌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 F018 のチロシンリン酸化について検討を行った。Src の恒常的活性化型変異体 (SrcCA) との共発現により、F018 がチロシンリン酸化されることが明らかになった。さらに、F018 の種々の変異体を用いることにより、F018 の 489 番目のチロシンが Src によりリン酸化されることが明らかとなった。一般的に、リン酸化チロシンが、Src homology (SH) 2 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。そこで、F018 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、Phosphoinositide 3 kinase regulatory subunit 3 (PI3KR3) および Abelson tyrosine kinase 1 (ABL1) と特異的に相互作用する可能性を見出した。今後、これらの相互作用の細胞機能について検討する必要があると考えられた。

(2) F018 と相互作用する蛋白質による制御

F018 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、Dbl homology (DH) ドメイン及び、pleckstrin homology (PH) ドメインを含む F018 の 1-465 アミノ酸配列 (aa) 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、Four and a half LIM domain 含有蛋白質 (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。さらに、培養細胞内において F018 と β - γ -アクチン及び FHL1 の全長との相互作用も明らかになった。また、F018 の各種変異体を用いた解析により、 β - γ -アクチンは、F018 の DH ドメインを含む 150-283 aa 内に、FHL1 は、F018 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。さらに、FHL1 及び、 β - γ -アクチンの F018 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 相互作用領域に重なりがあることから、F018 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。

上記に詳しく述べたように、本論文では、G β γ に加え、F018 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を明らかにした。本論文で注目している

F018 は、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、さらに F018 の構造の詳細などを検討することにより、それらの疾患も含め、F018 に関係する細胞骨格再構築機構の破綻に伴う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、この論文の有用性は極めて高い。従って、審査の結果、この論文を学位論文に値するものと判定した。

最終試験結果の要旨

この論文の主要部分は、審査付き論文として公表済みの 3 編の論文である。この論文が学位論文として完成された内容を有することを確認した。

公聴会において、学位論文の内容を中心として、またこれに関する事項、即ち Rho ファミリー低分子 G 蛋白質特異的グアニンヌクレオチド交換因子 PLEKHG2/FLJ00018 のリン酸化や他の生体分子との相互作用の細胞機能についてや、がんや神経疾患などの病態との関わりや本研究の今後の展開や将来性などに関して諮問を行った。論文申請者から、十分な内容を持った回答が得られたので、最終試験にも合格したと判定した。

論文リスト

1. Identification of a Rho family specific guanine nucleotide exchange factor, FLJ00018 as a novel actin-binding protein

Katsuya Sato, Hiroaki Handa, Masashi Kimura, Yukio Okano, Hitoshi Nagaoka, Takahiro Nagase, Tsuyoshi Sugiyama, Yukio Kitade, Hiroshi Ueda

Cellular Signalling, 25, 41-49 (2013) 【IF=4.304】

2. PLEKHG2/FLJ00018, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, is tyrosine phosphorylated via the EphB2/cSrc signaling pathway

Katsuya Sato, Takahiro Suzuki, Yoshihiro Yamaguchi, Yukio Kitade, Takahiro Nagase, Hiroshi Ueda

Cellular Signalling, 26, 691-696 (2014) 【IF=4.304】

3. 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

Katsuya Sato, Tsuyoshi Sugiyama, Takahiro Nagase, Yukio Kitade, Hiroshi Ueda

Journal of Biological Chemistry, in press 【IF=4.651】