

三量体 G 蛋白質 α サブユニットの活性を特異的に調節する
新しいタイプの制御分子 Ric-8A と YM-254890 の機能解析

西村 明幸

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞内情報学講座

(伊東 広 教授)

2007 年 1 月 29 日

目次

序章	3
第一章 非受容体型 G 蛋白質活性化因子 Ric-8A の機構解析	
1-1 序論	9
1-2 材料と方法	10
1-3 結果	13
1-4 考察	23
第二章 G_q シグナル阻害活性を示す環状デプシペプチド YM-254890 の 作用機構の解析	
2-1 序論	27
2-2 材料と方法	30
2-3 結果	34
2-4 考察	51
総括	57
謝辞	58
参考文献	59

序章

細胞はホルモン、神経伝達物質、サイトカイン、増殖因子といった多様な細胞外シグナル分子に応答することにより、周囲の環境に適切に対応し恒常性を維持することができる。これら細胞外シグナル分子の一部のものは細胞膜を通過して直接シグナル因子として作用するが、大部分のものは細胞膜を通過できないために細胞膜受容体に結合することにより細胞内にシグナルを伝達している。細胞膜受容体はチロシンキナーゼ型受容体、セリン-スレオニンキナーゼ型受容体、イオンチャネル型受容体、G蛋白質共役型受容体（GPCR）に大別される。チロシンキナーゼ型受容体、セリン-スレオニンキナーゼ型受容体は1回膜貫通型で細胞内領域にキナーゼ活性部位を持つ受容体であり、イオンチャネル型受容体は受容体自身がチャネルを形成しておりリガンド刺激に応じてイオンの流入を制御している。GPCRは細胞膜を7回貫通する構造をしており、ヒト遺伝子では約1000以上あることが予想され、最も大きなファミリーを形成している。それ故に、GPCRを介するシグナル伝達経路（G蛋白質シグナル伝達経路）は心臓血管系、内分泌系、免疫系、神経系や感覚系の発生、恒常性維持など幅広い生理現象に関与している（Wettschureck and Offermanns, 2005）。また、そのリガンドの種類もアミノ酸、イオン、ペプチド、脂質、光など多種にわたっている。

三量体 G 蛋白質の構造と機能

G蛋白質シグナル伝達経路において、GPCRに伝えられたシグナルをセカンドメッセンジャーを産生する効果器（エフェクター）に伝達する役割を果たすのが三量体G蛋白質（G蛋白質）である。G蛋白質は α 、 β 、 γ サブユニットからなるヘテロ三量体構造をとっている。 α サブユニット（ $G\alpha$ ）にはグアニンヌクレオチド結合部位が存在する。一方、 β サブユニットと γ サブユニットは常に複合体（ $G\beta\gamma$ ）を形成しており、生理条件下では両者は解離しないと考えられている。 $G\alpha$ は立体構造上、Ras-like GTPaseドメインとHelicalドメインに分けられる（図1）。Ras-like GTPaseドメイン内には全てのGTP結合蛋白質に共通してみられるG1からG5までの5つのGモチーフが存在し、ヌクレオチドとの結合に関与している。一方、Helicalドメインは他のGTP結合蛋白質には見られない $G\alpha$ 特有のドメインであるがその機能はあまり詳しくわかっていない。 $G\alpha$ はGDP結合時とGTP結合時とでコンホメーションを変化させることにより $G\beta\gamma$ 、エフェクター、その他の制御分子とのアフィニティーを変化させる。 $G\alpha$ のコンホメーションが変化する領域をスイッチ領域と呼び、Ras-like GTPaseドメイン内に3ヶ所存在する（Sprang, 1997）。

これまでに哺乳動物において $G\alpha$ は19種類報告されており、アミノ酸配列の相同

性とエフェクターの種類によって G_s 、 G_i 、 G_q と $G_{12/13}$ の 4 つのサブファミリーに分類されている (図 2)。 G_s サブファミリーはアデニル酸シクラーゼを活性化することによって cAMP の産生を促進する。逆に、 G_i サブファミリーはアデニル酸シクラーゼの活性化を阻害する。また、 G_i サブファミリーの $G\alpha_i$ や $G\alpha_{\text{gust}}$ はホスホジエステラーゼを活性化する。 $G_{12/13}$ サブファミリーは p115-RhoGEF、PDZ-RhoGEF、LARG を介して低分子量 GTPase である Rho の活性を制御する (Neves *et al.*, 2002)。一方、 G_q サブファミリーはヒトでは $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{11}$ 、 $G\alpha_{14}$ 、 $G\alpha_{16}$ ($G\alpha_{15}$ は $G\alpha_{16}$ のマウスホモログ) から構成されており、これら $G\alpha$ はすべてホスホリパーゼ C- β (PLC- β) を活性化し、 IP_3 の産生を介して細胞内カルシウムの上昇を引き起こす。発現分布としては $G\alpha_q$ がユビキタス、 $G\alpha_{11}$ もほぼユビキタスであるが血小板においては発現が見られない。一方、 $G\alpha_{14}$ 、 $G\alpha_{15}$ 、 $G\alpha_{16}$ は特異的な発現パターンを示し、 $G\alpha_{14}$ は腎臓、肺、膵臓などで発現が見られる。 $G\alpha_{15}$ と $G\alpha_{16}$ の発現はさらに限定されており、血球系細胞にのみ発現が確認されている。 G_q サブファミリーの生理機能としては、 $G\alpha_q$ と $G\alpha_{11}$ が心肥大や血管平滑筋の収縮など、様々な生理現象に関与しているのに対し、 $G\alpha_{14}$ 、 $G\alpha_{15}$ 、 $G\alpha_{16}$ の生理的役割についてはほとんどわかっていない (Hubbard and Hepler, 2006)。

G 蛋白質の GTPase サイクルと制御分子

GPCR からエフェクターにシグナルが伝達される過程において、G 蛋白質は活性型と不活性型の間で回転 (GTPase サイクル) している。この GTPase サイクルはグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF)、GTPase 活性化因子 (GAP)、GDP 解離阻害因子 (GDI) という 3 種類の制御分子によって制御されている (図 3)。まず定常状態においては、GDP 結合型 $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ が複合体を形成している。 $G\beta\gamma$ は GDI として $G\alpha$ からの GDP 解離を阻害することによって、 $G\alpha$ の不活性化状態を維持している。リガンド結合により活性化された GPCR は GEF として機能し、三量体 $G\alpha\beta\gamma$ と結合することで $G\alpha$ に結合していた GDP を GTP へ変換する。GTP 結合に伴う $G\alpha$ の構造変換により、 $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ は解離して、同時に GPCR からも解離する。そして、 $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ はそれぞれのエフェクターを活性化する。 $G\alpha$ は自身の持つ GTPase 活性によって GTP を加水分解することで GDP 結合型に戻り、 $G\beta\gamma$ と再結合して定常状態に戻る。 $G\alpha$ の GTPase 活性を促進し、G 蛋白質の活性化を抑制するのが GAP 活性をもつ RGS (Regulator of G-protein signaling) ファミリー蛋白質である (Gilman, 1987; Kaziro *et al.*, 1991)。

G 蛋白質制御因子の中で、特に解析が進められているのが RGS である。RGS ファミリー蛋白質は現在までに 20 以上のメンバーが発見されており、これらは全て約 120 アミノ酸からなる RGS ドメインを持っている。基本的な役割としては $G\alpha$ の GTPase 活性を促進することにより、G 蛋白質シグナルの迅速なシャットオフを誘導する

(Berman and Gilman, 1998; Ross and Wilkie, 2000)。RGS ファミリーの多様性とその生理学的意義に関しては最近勢力的に研究が進められており、個々の RGS は特定の GPCR を介したシグナル経路に特異的に作用することが明らかにされつつある。いくつかの RGS は特異的な発現パターンを示し、また多くの RGS はさまざまなドメインを持っている。リン酸化、パルミトイル化や他の蛋白質との相互作用を介して GAP 活性や局在を制御することで、機能の多様性を生んでいる (Riddle *et al.*, 2005)。さらに、RGS は G 蛋白質同様に幅広い生理現象に関与することが報告されており、G 蛋白質シグナル経路における重要な制御分子と考えられている (Hollinger and Hepler, 2002)。

一方、GoLoco ドメインをもつ LGN や AGS3 は比較的最近発見された G 蛋白質制御分子である。GoLoco ドメインは G $\beta\gamma$ 同様に GDI 活性を持っており (De Vries *et al.*, 2000; Natochin *et al.*, 2000)、その機能としては GoLoco 蛋白質が G α と結合することで G $\beta\gamma$ が解離して、G $\beta\gamma$ を介したシグナルが活性化する (Bernard *et al.*, 2001; Natochin *et al.*, 2001)。GoLoco 蛋白質の生理的役割は線虫やショウジョウバエの研究から調べられており、線虫初期胚とショウジョウバエ neuroblast の非対称分裂時において紡錘体の運動性に関わる G 蛋白質シグナルの制御を行っていることが報告されている (Schaefer *et al.*, 2000; Willard *et al.*, 2004)。

本研究について

RGS や GoLoco 蛋白質の研究から G 蛋白質シグナル経路におけるこれら制御分子の重要性が明らかにされてきた。近年、RGS や GoLoco 蛋白質以外にも AGS1 や GRIN などを始め、G 蛋白質の GTPase サイクルを制御する活性を持った蛋白質がいくつか報告されており (Blumer *et al.*, 2005)、これら新規制御分子が G 蛋白質の活性を制御する作用機構や G 蛋白質シグナルにおける生理的役割について興味を持たれている。私は、本研究において G α_q の新たな制御分子として期待される Ric-8A と YM-254890 について研究を行った。第一章では、GEF 活性を持った制御分子 Ric-8A が G 蛋白質シグナル経路に果たす役割について解析を行い、第二章では、G $_q$ シグナルを阻害する働きを持った環状デプシペプチド YM-254890 が G α_q の活性を制御する詳細な作用機構について解析を行った。

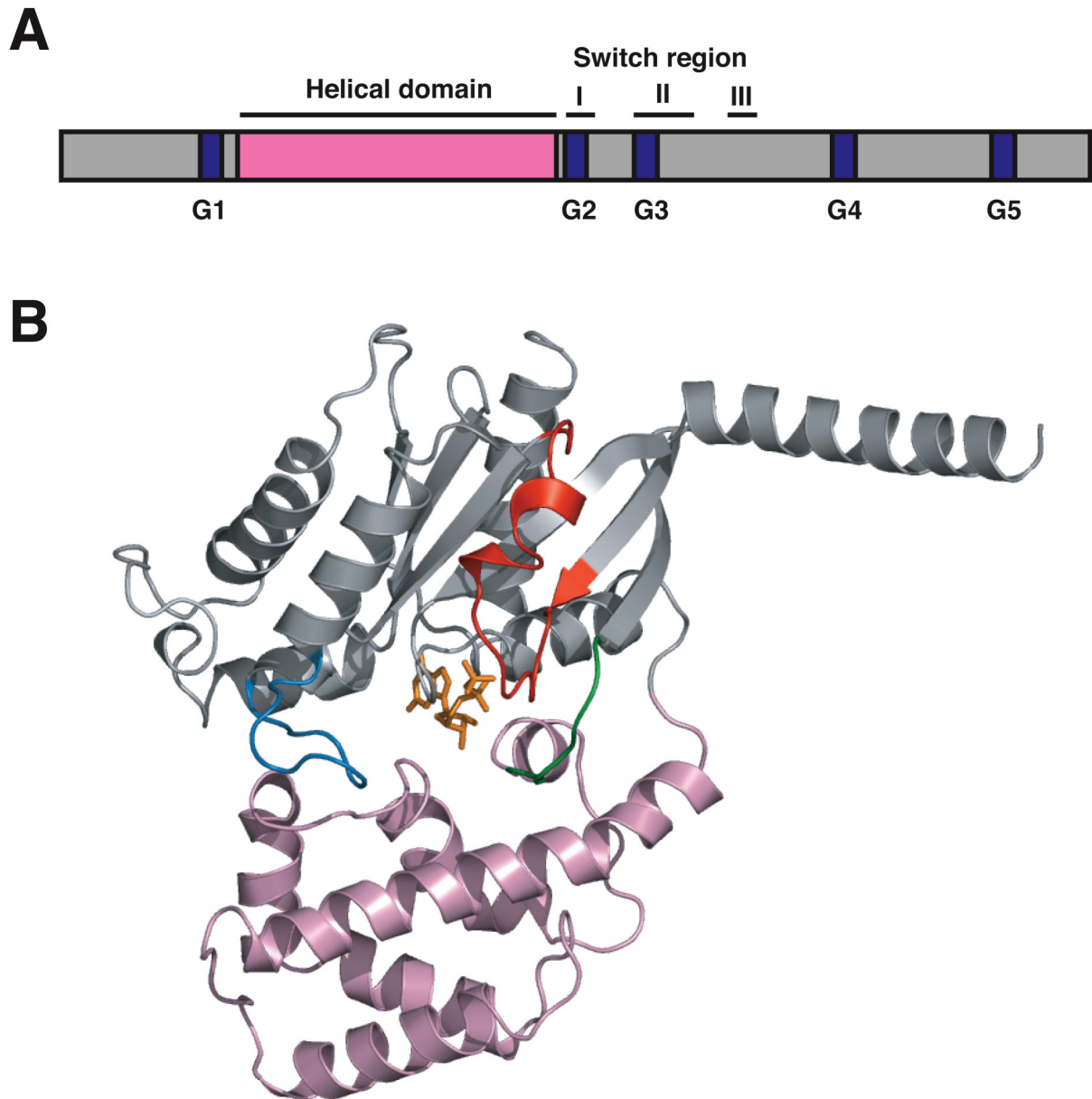


図1 G 蛋白質 α サブユニット ($G\alpha$) の構造

A) 一次構造の模式図。Ras-like GTPase ドメインを灰色、Helical ドメインをピンク色、5つの G モチーフを青色で示す。

B) $G\alpha_i$ の立体構造。GDP 結合型 $G\alpha_i$ (PDB 番号:1GP2) の構造の内、Ras-like GTPase ドメインを灰色、Helical ドメインをピンク色で示す。また、Ras-like GTPase ドメイン内のスイッチ I を緑色、スイッチ II を赤色、スイッチ III を水色で示す。 $G\alpha_i$ に結合した GDP をオレンジ色で示す。

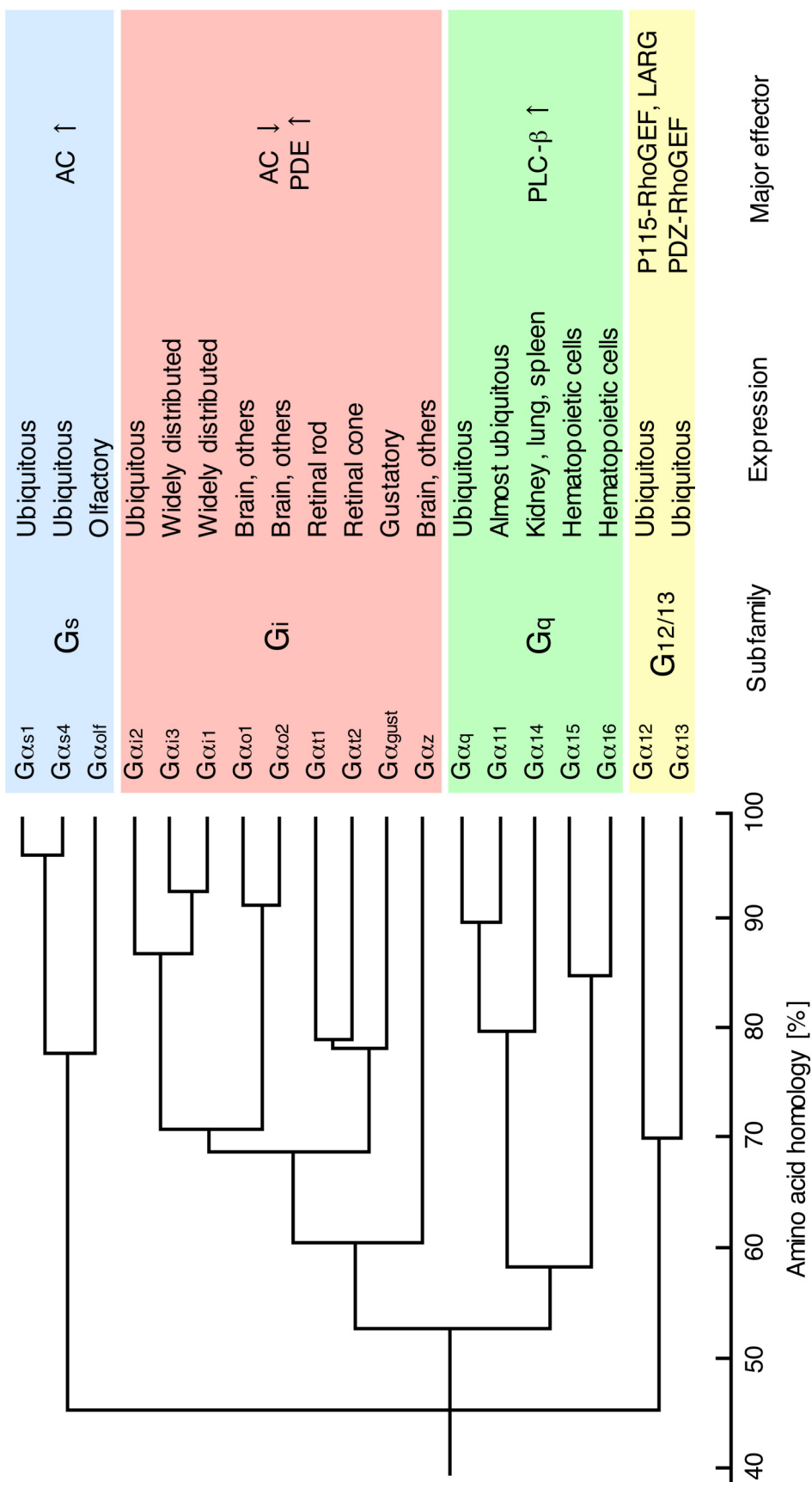


図2 Gαの多様性
 哺乳動物における19種類のGαのアミノ酸相同性、サブファミリー、発現分布と主要エフェクターを示す。
 AC: adenylyl cyclase、PDE: phosphodiesterase、PLC: phospholipase C、RhoGEF: Rho guanine nucleotide exchange factor

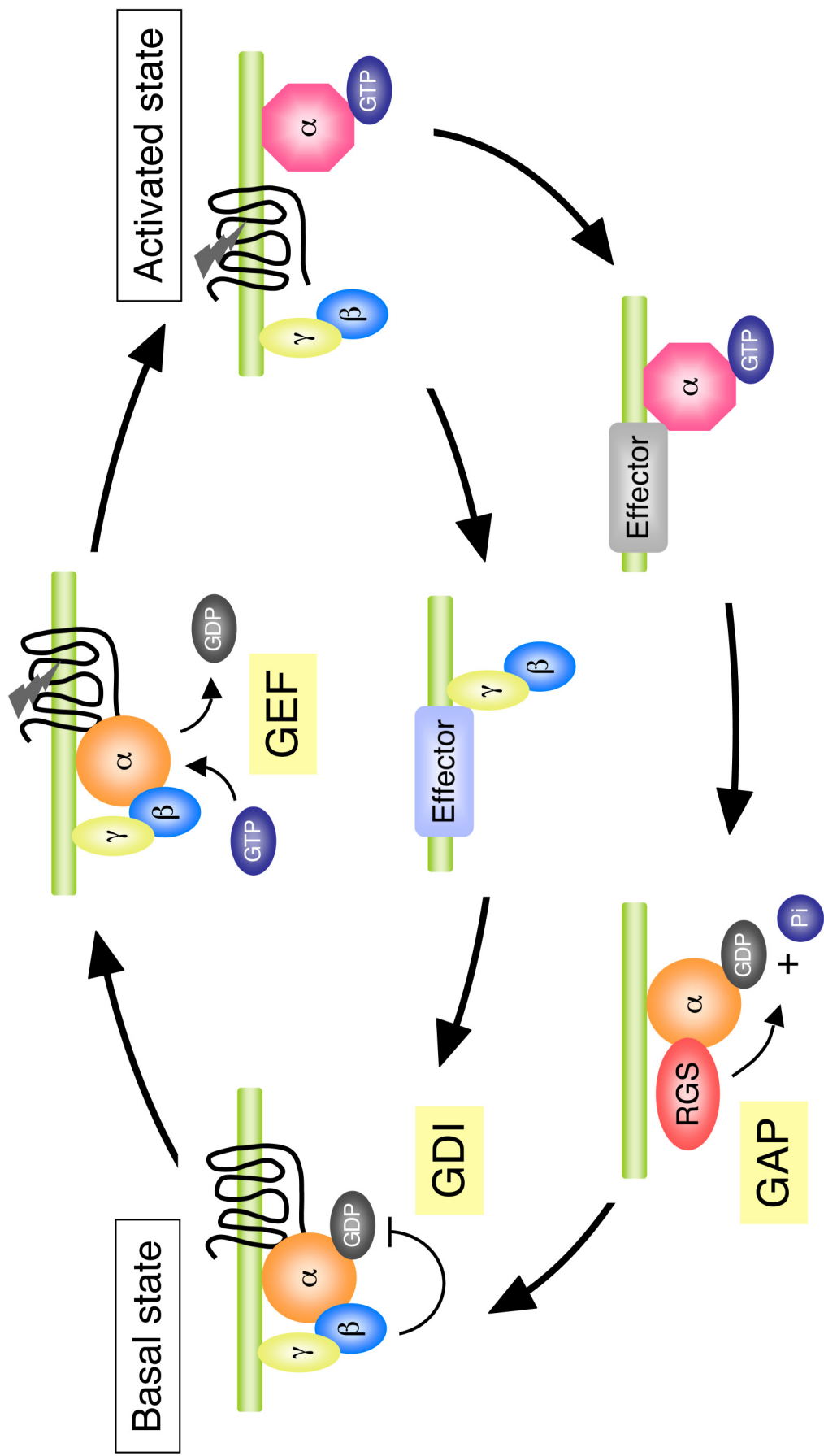


図3 G蛋白質のGTPaseサイクル
 不活性化状態においてGβγはGαと結合してGαのヌクレオチド交換を抑制している。リガンド結合型GPCRがGαのヌクレオチド交換を促進すること、活性化状態に移行する。解離したGα、Gβγ共にエフェクターを活性化する。RGSによりGαのGTPase活性が促進され、GαとGβγが再結合して元に戻る。
 GEF: guanine nucleotide exchange factor、GAP: GTPase activating protein、GDI: GDP dissociation inhibitor

第一章 非受容体型 G 蛋白質活性化因子 Ric-8A の機能解析

1-1 序論

RGS や GoLoco、その他近年発見されている新しい制御分子のほとんどのものが G_i サブファミリーに作用する分子であり、 G_q サブファミリーに働く制御分子としてはいくつもの RGS が報告されているだけであった。 $G\alpha_q$ に対する新しい制御分子を同定する為に、当研究室において $G\alpha_q$ をベイトとした酵母 Two-hybrid screening が行われ、Ric-8A (Resistance to inhibitors of cholinesterase-8A) が同定された (岡本, 2003)。

Ric-8A は線虫 RIC-8 の哺乳類ホモログである。RIC-8 はアセチルコリン分解酵素の阻害剤に耐性を示す線虫変異体の原因遺伝子として同定された (Miller *et al.*, 1996)。線虫の神経筋接合部における神経伝達物質の放出は $G\alpha_q$ - $G\alpha_o$ を介したシグナル経路により制御されている。EGL-30 ($G\alpha_q$) は EGL-8 (PLC- β) を活性化し、Diacylglycerol (DAG) を産生する。一方、GOA-1 ($G\alpha_o$) は、DAG 量を減少させる DGK-1 (DAG kinase) を活性化することによってネガティブに制御している (Lackner *et al.*, 1999; Nurrish *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1999)。Miller らは 2000 年に RIC-8 と EGL-30 の機能低下型変異体を用いた遺伝学的解析から、RIC-8 が EGL-30 の上流か並んで機能することを報告しており、RIC-8 が G 蛋白質シグナルに関わることが示唆されていた (Miller *et al.*, 2000)。

我々が $G\alpha_q$ の相互作用分子として Ric-8A を同定したすぐ後に、Tall らによって Ric-8A が G 蛋白質の新しいタイプの制御分子であることが報告された (Tall *et al.*, 2003)。彼らは、Ric-8A が *in vitro* において $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_o$ と $G\alpha_q$ に対して GEF 活性を持つことを明らかにした。これまでに GPCR と同じように三量体 $G\alpha\beta\gamma$ に対して GEF 活性を持つ非受容体型分子はいくつか知られていた (Sato *et al.*, 1996; Blumer *et al.*, 2005)。しかし、Ric-8A はこれらの分子とは違い、単量体 $G\alpha$ にのみ GEF 活性を示し、三量体 $G\alpha\beta\gamma$ には作用しないという性質を持っていた。このような特徴的な GEF 活性をもつ Ric-8A が G 蛋白質シグナルの制御にどう関与するのかは非常に興味深かった。しかしながら、遺伝学的解析から線虫 RIC-8 が G_q シグナル経路に関与することは示唆されているにもかかわらず、哺乳動物細胞においても Ric-8A が G_q シグナル経路に関与しているのかは明らかにされていなかった。そこで第一章では、哺乳動物細胞での G_q シグナル経路における Ric-8A の役割について解析を行った。

1-2 材料と方法

発現ベクターの構築

マウス Ric-8A をコードする cDNA は、FLAG タグを発現する哺乳動物細胞発現ベクター pCMV5-FLAG と GST タグを発現する哺乳動物細胞発現ベクター pCMV5-GST に組み込んだ。Ric-8A の N 末断片と C 末断片をコードする cDNA は、Ric-8A の cDNA を鋳型とした PCR により増幅し、pCMV5-FLAG に組み込んだ。ミリストイル化シグナル融合 Ric-8A 変異体を作製するために、まずミリストイル化シグナル発現ベクター pEGFP-myr-N3 に Ric-8A の cDNA を組み込んだ (Miyamoto *et al.*, 2004)。次に、EGFP をコードしている領域を削り、FLAG タグ配列を組み込むことにより pMyr-Ric-8A-FLAG を作製した。

細胞培養と遺伝子導入

ヒト胎児腎由来 293T 細胞は、10%牛胎児血清と 100 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシンを加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。細胞への遺伝子導入はリン酸カルシウム法もしくは LipofectAMINE™ 2000 を用いて行った。

免疫沈降とウエスタンブロット

293T 細胞を Lysis buffer (20 mM Hepes (pH7.5), 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 20 mM β -Glycerophosphate, 0.5% Lubrol-PX, 1 mM PMSF, and 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin) で溶解した。AlF₄⁻処理を行う場合、まず AlF₄⁻ (10 mM MgCl₂, 5 mM NaF, 50 μM AlCl₃) を培地中に加え 3 時間 293T 細胞を培養した後、AlF₄⁻を含む Lysis buffer で溶解した。14,000 xg で 10 分遠心後の上清を細胞抽出液として回収し、抗 FLAG 抗体と Protein G-Sepharose (GE ヘルスケア) を加え、4°C で 1 時間インキュベーションした。Lysis buffer で 3 回洗浄した後、Laemmli sample buffer を加え 95°C で 5 分間煮沸することにより、免疫沈降物を得た。試料を SDS-PAGE で展開した後、PVDF 膜 (Millipore) に転写した。PVDF 膜を 5% スキムミルクを含む TBS-T (20 mM Tris (pH7.6), 137 mM NaCl, and 0.1% Tween-20) で 1 時間ブロッキングした後、1 次抗体で 2 時間インキュベーションした。TBS-T で 3 回洗浄した後、HRP 付加 2 次抗体 (GE ヘルスケア) で 30 分処理し、ECL (GE ヘルスケア) を用いてシグナルを検出した。

MAP キナーゼアッセイ

293T 細胞にトランスフェクションを行い 24 時間培養した後、培地を無血清 DMEM に交換してさらに 24 時間培養した。百日咳毒素 PTX (200 ng/ml, 18 時間), G_q 阻害剤 YM-254890 (10 μ M, 1 時間) で前処理した後、100 μ M ATP, 100 nM エンドセリン-1 (ET-1), 100 μ M *m*-3M3FBS で 5 分間細胞を刺激した。Lysis buffer で細胞を溶解した後、抗リン酸化 ERK 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。シグナルの強度は LAS-1000 image analyzer (Fujifilm) を用いて定量した。定量後、PVDF 膜を抗 ERK 抗体でリブロットした。

免疫染色

トランスフェクション 24 時間後、293T 細胞をコラーゲンコートしたカバーグラスにまき直し、さらに 20 時間培養した。培地を Krebs-Ringer-Hepes buffer (20 mM Hepes (pH7.5), 136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM $CaCl_2$, 1.25 mM $MgSO_4$, and 1% BSA) に交換して 3 時間インキュベーションした。細胞を 10 μ M pirenzepine で 10 分間前処理した後、10 μ M carbachol で任意の時間刺激を行った。4% PFA/PBS で細胞を 20 分間固定した後、0.1% Triton X-100/PBS で 5 分間透過処理を行った。10%FBS/PBS で 1 時間ブロッキングを行った後、抗 FLAG 抗体 (2.5 μ g/ml) を用いて 2 時間一次抗体処理を行った。PBS で洗浄後、細胞を Alexa Fluor 488 結合抗マウス抗体 (Molecular Probes) (1000 倍希釈) で 1 時間インキュベーションした。Perma Fluor (Shandon) でカバーグラスをマウントし、共焦点レーザー走査顕微鏡 LSM510 (Zeiss) を用いて観察した。

細胞内カルシウム測定

細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は Ca 蛍光指示薬 Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2/AM) を用いて測定した。293T 細胞を Suspension buffer (20 mM Hepes (pH7.5), 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgCl_2$, and 5.6 mM glucose) で洗浄した後、同じバッファーを用いてピペッティング操作により dish から剥がし、懸濁した。この懸濁液に 2 μ M Fura-2/AM を加え、30°C で 40 分間インキュベーションすることで Fura-2/AM を細胞内に取り込ませた。その後、余分な Fura-2/AM を取り除くために Suspension buffer を用いた遠心操作により細胞を洗浄した。 $[Ca^{2+}]_i$ の蛍光測定は分光蛍光光度計 F-2000 (Hitachi) を用いて行った。8 x 10⁵ 個の細胞が入ったキュベットを 37°C に保持したセルホルダーにセットした。細胞を 10 μ M YM-254890 で 5 分間前処理した後、100 nM ET-1, 100 μ M *m*-3M3FBS で刺激した。

GTP γ S 結合実験

FLAG-Ric-8A をトランスフェクションした 293T 細胞から細胞抽出液を調製した後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物を Lysis buffer で 2 回、Reaction buffer (20 mM Hepes (pH8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM MgSO₄, and 0.05% Genapol C-100) で 2 回洗浄した。そこに、100 nM の精製 G_q と 10 μ M [³⁵S]GTP γ S (10,000 cpm/pmol) を加え、20°C で 6 時間インキュベーションした。氷冷した Stop buffer (20 mM Tris (pH7.7), 100 mM NaCl, 2 mM MgSO₄, 0.05% Genapol C-100, and 1 mM GTP) を加えて反応を停止させた後、反応液をニトロセルロース膜に通した。その後、膜を氷冷した Wash buffer (20 mM Tris (pH7.7), 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄) で 2 回洗浄し、風乾した。G_q に取り込まれた GTP γ S の量は、LS6500 液体シンチレーションカウンター (Beckman) で膜に吸着した ³⁵S のカウントを測定することで算出した。

細胞分画

トランスフェクション 48 時間後、293T 細胞を Buffer A (20 mM Tris(pH7.5), 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 250 mM sucrose, 1 μ g/ml leupeptin, and 1 mM PMSF) に懸濁し、Potter-Elvehjem homogenizer を用いてホモジェネートした。試料を 1,000 xg で 10 分間遠心することにより、核と未破壊細胞を取り除き、上清をさらに 100,000 xg で 45 分間遠心した。その上清を細胞質画分、沈殿物を膜画分として実験に用いた。

siRNA の調製と細胞への導入

二本鎖 RNA オリゴヌクレオチドは Dharmacon 社に合成を依頼した。Ric-8A に対する siRNA の配列には 5'-GCUUGUCCGCCUCAUGACAdTdT を選んだ。dT はデオキシチミジンを示す。siRNA の 293T 細胞への導入は LipofectamineTM2000 を用いて行った。

1-3 結果

1) Ric-8A の G_q 結合領域の同定

当研究室ではこれまでに Yeast two-hybrid 法を用いて G_q の相互作用因子として Ric-8A を同定していた。Ric-8A の G_q 結合領域を同定するために、まず Ric-8A のアミノ酸配列のモチーフ検索を行ったが、一次構造上既知の分子と相同性を示すドメイン構造は見つからなかった。そこで Ric-8A の N 末、C 末をそれぞれ欠失させた変異体を作製することにより (図 1-1 A)、Ric-8A の G_q 結合領域の同定を試みた。293T 細胞に G_q および FLAG タグを融合した Ric-8A 全長もしくは部分欠失変異体を発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行った。その結果、Ric-8A の全長および N 末側 301 アミノ酸を含む変異体において G_q との共沈降が確認された (図 1-1 B)。

これまでに Ric-8A は *in vitro* において G_q に対し GEF 活性を持つことが報告されている (Tall *et al.*, 2003)。そこで、G_q との相互作用が確認できた Ric-8A の N 末 301 アミノ酸部位 (N301) が G_q に対する GEF 活性を保持しているかを検討した。FLAG-Ric-8A を免疫沈降してきたところに、精製 G_q と [³⁵S]GTPγS を加えてヌクレオチド交換を誘導した。Ric-8A はこれまでの報告通り G_q のヌクレオチド交換を促進したのに対し、N301 では GEF 活性が全く見られなかった。さらに別の部分欠失変異体を用いて検討を行って見たところ、N479 では全長に比べ半分程度 GEF 活性が検出できたが、それ以上 C 末領域を欠失させた変異体では GEF 活性が消失していた (図 1-1 C)。また、一般的に GEF は不活性型の G 蛋白質と強く相互作用し、活性型では相互作用が弱まることが知られている。そこで γ 位リン酸を模倣する AlF₄⁻を用いて G_q を活性化することで Ric-8A, N301 との相互作用に変化が見られるかを検討した。その結果、Ric-8A は AlF₄⁻処理依存的に G_q との相互作用が減弱したのに対し、N301 ではそのような効果は見られなかった (図 1-1 D)。以上の結果から考えて、Ric-8A は N 末側 301 アミノ酸の領域で G_q と相互作用しているが、GEF 活性を示すには全長の構造が必要であると考えられた。

2) Ric-8A の発現分布解析

まず、マウス組織における Ric-8A の発現分布を調べるために、成体マウスの各組織から組織抽出液を調製し、SDS-PAGE で展開後、抗 Ric-8A 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。分子量 63 kDa の Ric-8A は調製したすべての組織において発現が確認された (図 1-2 A)。これまでに Ric-8A 遺伝子は初期マウス胎児の神経系で強く発現していることが報告されていることから (Tonissoo *et al.*, 2003)、脳の発生段階における Ric-8A の発現変動について検討した。しかしながら、胎生 15 日から成体ま

でのラット脳抽出液において、Ric-8A の発現に変動は見られなかった (図 1-2 B)。また、さまざまなヒト由来の細胞株において Ric-8A の発現を調べた結果、すべての細胞株で発現が確認された (図 1-2 C)。以上の結果から、Ric-8A はユビキタスに発現していることが示唆された。

3) Ric-8A の発現抑制は G_q 共役型受容体を介した細胞応答を抑制する

Ric-8A は $G\alpha_q$ と相互作用し、また *in vitro* において $G\alpha_q$ に対し GEF 活性を示すことから、細胞内においても G_q シグナル経路の制御因子として機能していることが考えられた。そこで内在的に Ric-8A を発現している 293T 細胞をモデル細胞とし、Ric-8A の発現抑制が G_q シグナル経路の活性化に及ぼす効果を検討した。まず、Ric-8A の発現を抑制するために、図 1-3 A に示した siRNA (siRic-8A) を設計した。この siRic-8A を 293T 細胞にトランスフェクションすることで、Ric-8A の発現が顕著に抑制されることをウエスタンブロットで確認した (図 1-3 A)。 G_q シグナル経路の活性化の指標としてまずは MAP キナーゼに着目した。HEK293 細胞には G_q 共役型のプリン受容体 $P2Y_1$ と $P2Y_2$ が発現しており、MAP キナーゼの一種である ERK のリン酸化を引き起こすことが報告されている (Schachter *et al.*, 1997)。一方で、他の細胞において G_i 共役型のプリン受容体 $P2Y_{12}$ やイオンチャネル型プリン受容体 P2X においても ERK のリン酸化が引き起こされることが知られている (Czajkowski *et al.*, 2004; Amstrup and Novak, 2003)。そこで、本実験に用いた 293T 細胞において、プリン受容体のリガンド ATP により誘導される ERK のリン酸化が G_q シグナル経路を介しているのかを検討した。ATP 刺激による ERK のリン酸化は $G_{q/11}$ の特異的阻害剤 YM-254890 (Takasaki *et al.*, 2004) の前処理により抑制されたのに対し、 G_i の特異的阻害剤である百日咳毒素 (PTX) の前処理では抑制されなかった。加えて、 $G_{12/13}$ シグナルを阻害する LSC-RGS や $G\beta\gamma$ シグナルを阻害する β ARKct の過剰発現も効果を及ぼさなかったことから、ATP 刺激による ERK のリン酸化は G_q シグナル経路を介して起こることが確かめられた (図 1-3 B)。一方、エンドセリン-1 (ET-1) 刺激による ERK のリン酸化は YM-254890 と PTX で部分的に抑制されたことから、 G_q と G_i 両方のシグナルを介して起こることがわかった (図 1-3 C)。

次に、コントロールとして siGFP もしくは siRic-8A をトランスフェクションした 293T 細胞において、ATP, ET-1 刺激による ERK のリン酸化を定量した。その結果、Ric-8A の発現抑制により ATP, ET-1 刺激による ERK のリン酸化は約 30%減少した。一方、 $G\alpha_q$ の下流エフェクターである PLC- β の活性化剤 *m*-3M3FBS (Bae *et al.*, 2003) による ERK のリン酸化に対しては、Ric-8A の発現抑制は効果を示さなかった (図 1-3 D)。

G_q シグナルの活性化は、MAP キナーゼの活性化以外に細胞内カルシウム濃度の一過的な上昇を引き起こすことが知られている。そこで、 $G\alpha_q$ を介した細胞内カルシウム上昇における Ric-8A の発現抑制の効果を検討した。まず、ET-1 刺激によるカルシウム上昇が G_q シグナル経路を介して起こることを YM-254890 処理により確認した (図 1-4 A)。ET-1 刺激による細胞内カルシウム濃度上昇は、Ric-8A の発現抑制によって低下した (図 1-4 B, D)。一方、Ric-8A の発現抑制は *m*-3M3FBS 刺激による細胞内カルシウム濃度上昇には影響を与えなかった (図 1-4 C, D)。以上の結果から、Ric-8A は G_q シグナル経路に対してポジティブに作用し、また PLC- β の活性化よりも上流で機能していることが示唆された。

4) Ric-8A は G_q 共役型受容体の活性化により細胞膜に移行する

Ric-8A が G_q シグナル経路の活性化を促進する作用機構を明らかにするために、293T 細胞における Ric-8A の局在を調べた。まず、293T 細胞を細胞分画法により細胞質画分と膜画分に分離して、それぞれの画分での Ric-8A と $G\alpha_q$ をウエスタンブロットにより検出した。内在性 Ric-8A と過剰発現させた FLAG-Ric-8A は共に細胞質画分で検出されたのに対し、内在性の $G\alpha_q$ は膜画分でのみ検出された (図 1-5 A)。このことから、定常状態において Ric-8A は $G\alpha_q$ と相互作用していないと考えられた。

哺乳動物に存在するもう 1 つの RIC-8 ホモログである Ric-8B が PC12、SH-SY5Y 細胞において G_s もしくは G_q シグナル依存的に細胞膜に移行することが報告されている (Klattenhoff *et al.*, 2003)。Ric-8A も G_q 共役型受容体の活性化に伴って細胞膜に移行するのかを免疫染色により検討した。FLAG-Ric-8A と G_q 共役型受容体である m1 muscarinic acetylcholine 受容体をトランスフェクションした 293T 細胞をアゴニストである 10 μ M carbachol で刺激した。無刺激時、FLAG-Ric-8A は細胞質中に均一に分布していたが (図 1-5 Ba)、carbachol 刺激 3 分、5 分後では一部の FLAG-Ric-8A が細胞膜に局在していることが観測された (図 1-5 Bb, c)。また、pirenzepine (m1 muscarinic acetylcholine 受容体選択的アンタゴニスト) で前処理を行った場合には、carbachol 刺激による FLAG-Ric-8A の膜移行は観測されなかった (図 1-5 Bd)。これらの結果は、 G_q 共役型受容体の活性化に伴って Ric-8A の一部が細胞膜に移行して、 $G\alpha_q$ と相互作用することを示唆している。

5) Ric-8A の膜移行は G_q シグナルを介した細胞応答を促進する

図 1-5 の結果から Ric-8A の膜移行がその機能に重要であることが示唆されたので、膜局在型 Ric-8A 変異体 (Myr-Ric-8A) を作製し、 G_q シグナルを介した細胞応答に及

ぼす効果を検討した。Myr-Ric-8A は c-Src のミリスチル化シグナル配列を Ric-8A の N 末に融合することにより作製した (図 1-6 A)。まず、Myr-Ric-8A が細胞膜に局在することを細胞分画と免疫染色により確認した (図 1-5 A と 1-6 B)。次に、FLAG-Ric-8A もしくは Myr-Ric-8A-FLAG をトランスフェクションした 293T 細胞を用いて、ATP 刺激による ERK の活性化を測定した。Myr-Ric-8A-FLAG をトランスフェクションした 293T 細胞では、コントロールに比べ ATP 刺激による ERK の活性化が顕著に促進された (図 1-6 C)。さらに、Myr-Ric-8A による促進効果は YM-254890 の前処理により抑制された (図 1-6 E)。一方で、Myr-Ric-8A-FLAG は *m*-3M3FBS 刺激による ERK の活性化には促進効果を示さなかった (図 1-6 D)。これらの結果から、Ric-8A の膜局在化が、G_q シグナルの促進効果に重要であることが示唆された。

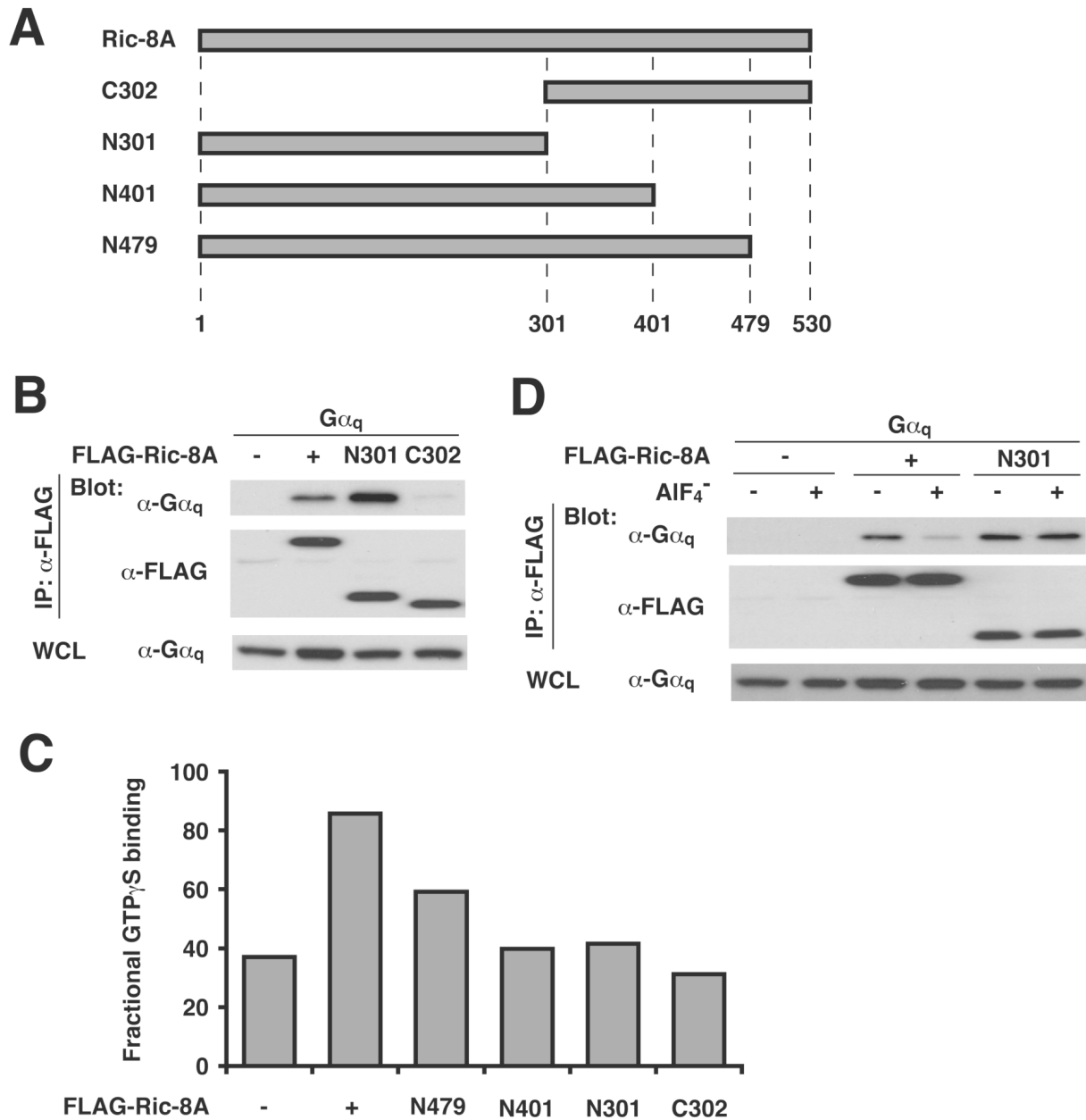


図 1-1 Ric-8A の $G\alpha_q$ 結合領域の決定

A) Ric-8A 全長および作製した部分欠失変異体の構造。

B) 免疫沈降法による FLAG-Ric-8A と $G\alpha_q$ の相互作用解析。293T 細胞に FLAG-Ric-8A、C 末欠失変異体 N301、N 末欠失変異体 C302 と $G\alpha_q$ をトランスフェクションした。細胞抽出液を調製し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈した $G\alpha_q$ をウエスタンブロットで検出した。

C) Ric-8A 部分欠失変異体の GEF 活性。FLAG-Ric-8A、もしくは部分欠失変異体をトランスフェクションした 293T 細胞抽出液から抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降産物を精製 $G\alpha_q$ と [35 S]GTP γ S と共にインキュベーションした。 $G\alpha_q$ への [35 S]GTP γ S の結合を測定した。

D) AIF_4 依存的な FLAG-Ric-8A と $G\alpha_q$ の相互作用。FLAG-Ric-8A、もしくは N301 と $G\alpha_q$ をトランスフェクションした 293T 細胞を AIF_4 で 3 時間処理した。その後、細胞抽出液を調製し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈した $G\alpha_q$ をウエスタンブロットで検出した。

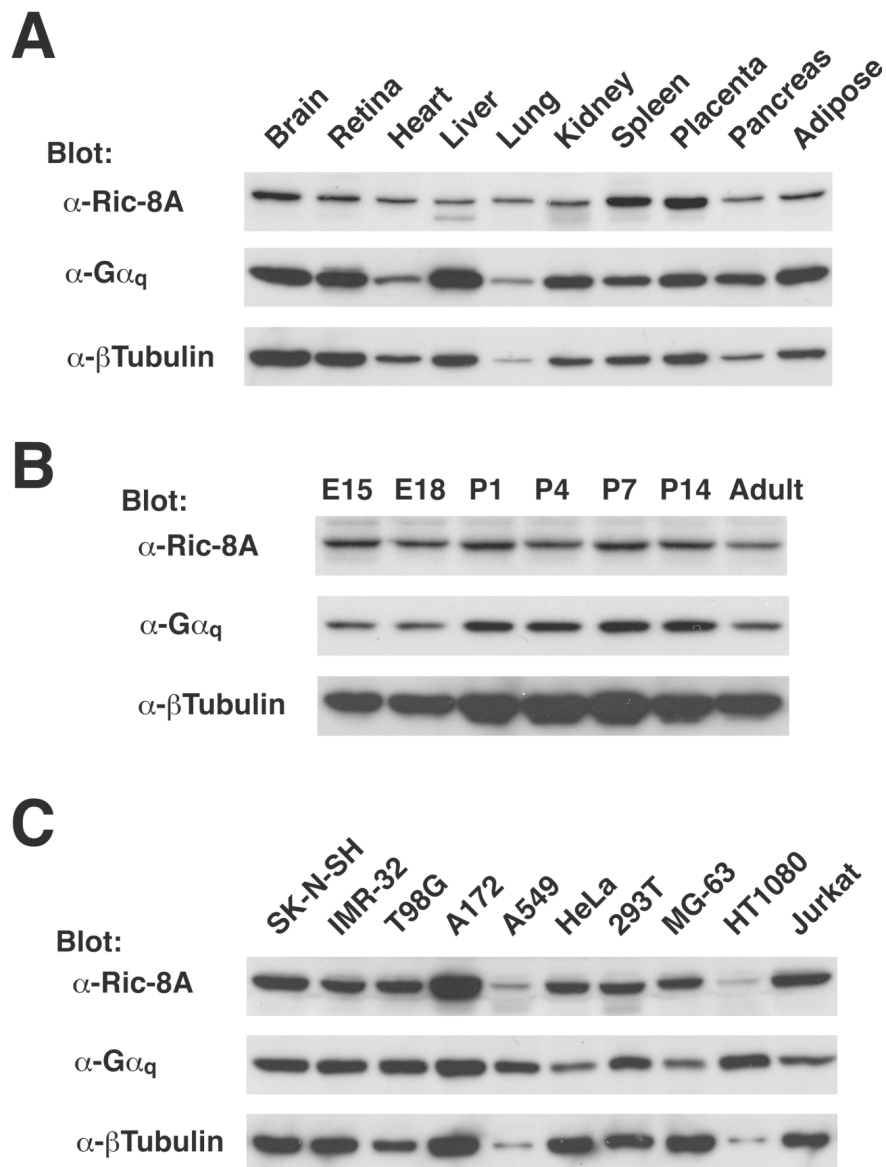


図 1-2 Ric-8A の発現解析

(A)マウス組織、(B)各発生ステージのラット脳、(C)各種ヒト細胞株から細胞抽出液を調製した。10 μ g の細胞抽出液を SDS-PAGE で展開した後、抗 Ric-8A 抗体、抗 G α_q 抗体、抗 β -Tubulin 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

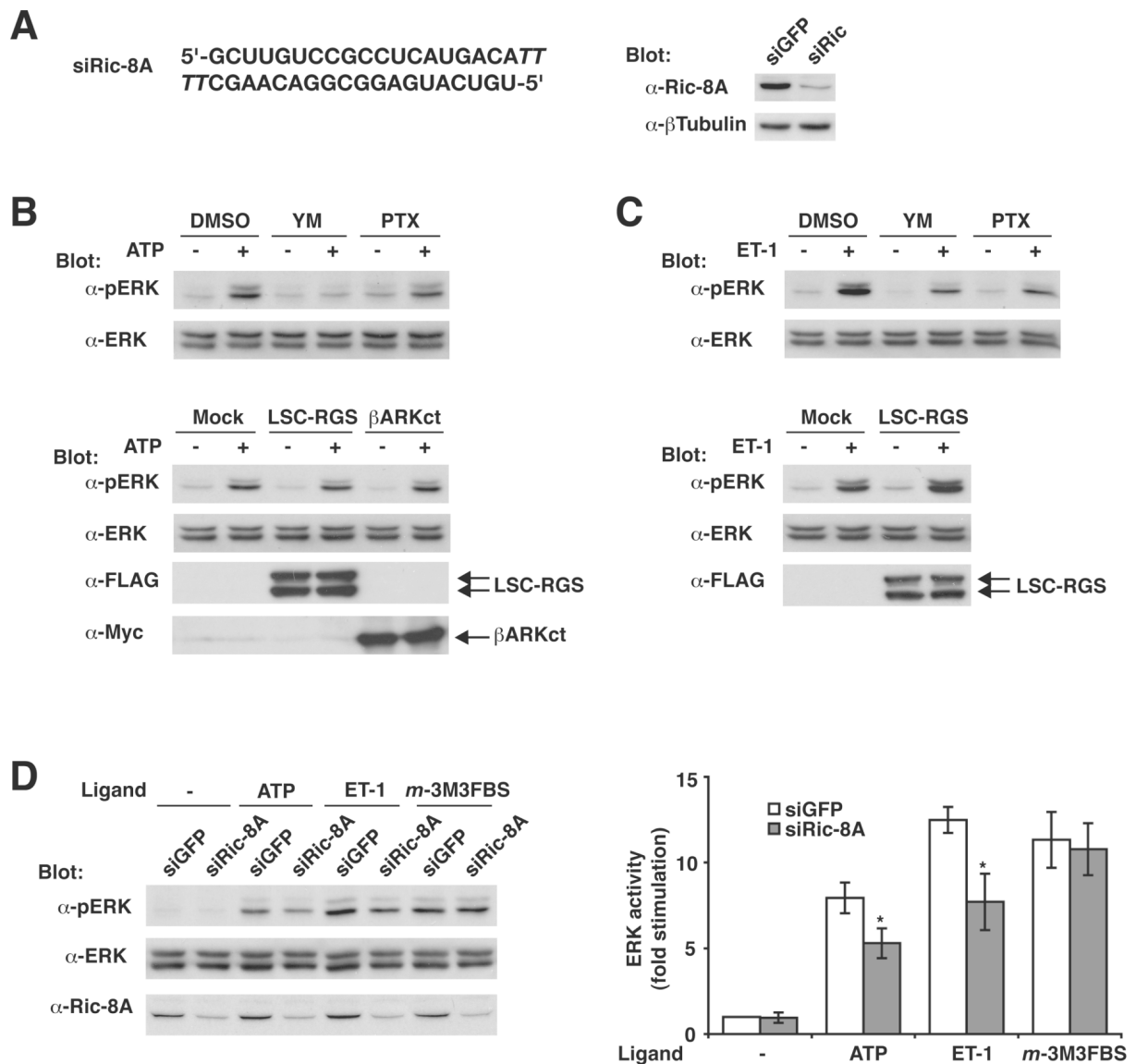


図 1-3 Ric-8A 発現抑制細胞での G_q 共役型受容体を介した ERK の活性化

A) Ric-8A に対する siRNA の配列。TT は 2'-deoxythymidine を示す。20 nM siGFP もしくは siRic-8A をトランスフェクションした 293T 細胞から細胞抽出液を調製し、Ric-8A の発現を確認した。

B、C) 293T 細胞を 10 μ M YM-254890 (YM) で 1 時間、もしくは 200 ng/ml PTX で 18 時間前処理した。もしくは 293T 細胞に LSC-RGS、 β ARKct をそれぞれトランスフェクションした。(B) 100 μ M ATP、(C) 100 nM ET-1 で 5 分刺激した後、細胞抽出液を調製した。ERK の活性化は抗リン酸化 ERK 抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。

D) 20 nM siGFP (白色)、siRic-8A (灰色) をトランスフェクションした 293T 細胞を、100 μ M ATP、100 nM ET-1、100 μ M *m*-3M3FBS でそれぞれ 5 分間刺激した。細胞抽出液を調製し、抗リン酸化 ERK 抗体でウエスタンブロットを行い、定量した。右グラフのそれぞれの値は 4 回の独立した実験からの平均値と標準偏差を示す。* $P < 0.01$ 。

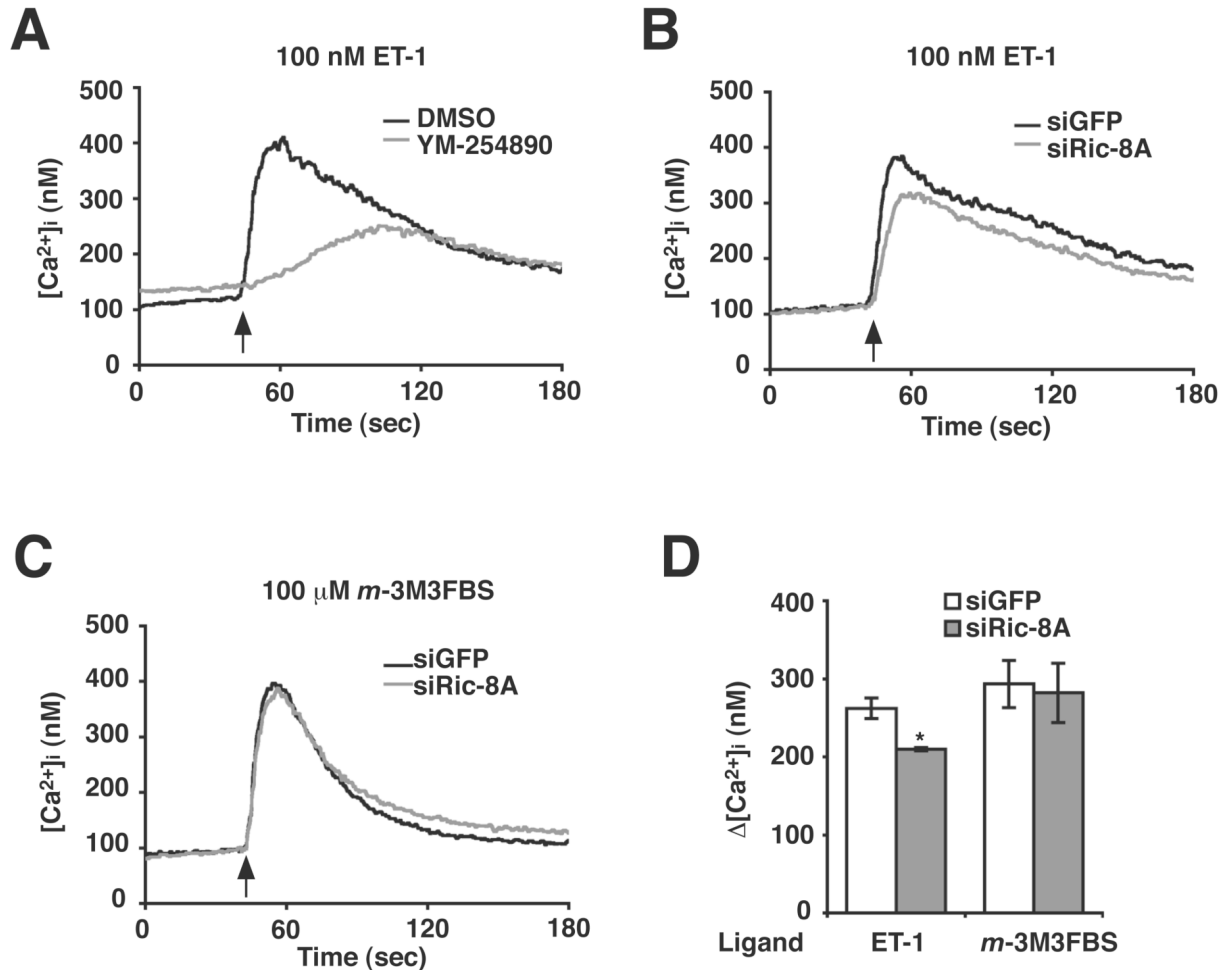


図 1-4 Ric-8A 発現抑制細胞での G_q 共役型受容体を介した細胞内カルシウムの上昇

A) 293T 細胞にカルシウム蛍光指示薬 Fura-2/AM を取り込ませた後、DMSO (黒色)、10 μ M YM-254890 (灰色) で 5 分間前処理した。矢印で 100 nM ET-1 を加え、細胞内カルシウム濃度変化をモニタリングした。

B、C) siGFP (黒色)、siRic-8A (灰色) をトランスフェクションした 293T 細胞を(B) 100 nM ET-1、(C) 100 μ M *m*-3M3FBS で刺激し、細胞内カルシウム濃度変化をモニタリングした。

D) (B) ET-1、(C) *m*-3M3FBS で誘導された細胞内カルシウム濃度変化の統計解析。 $\Delta[Ca^{2+}]_i$ はリガンド刺激後の最大カルシウム濃度値から刺激直前のカルシウム濃度値を引いた値を示す。それぞれの値は 4 回の独立した実験からの平均値と標準偏差を示す。* $P < 0.01$ 。

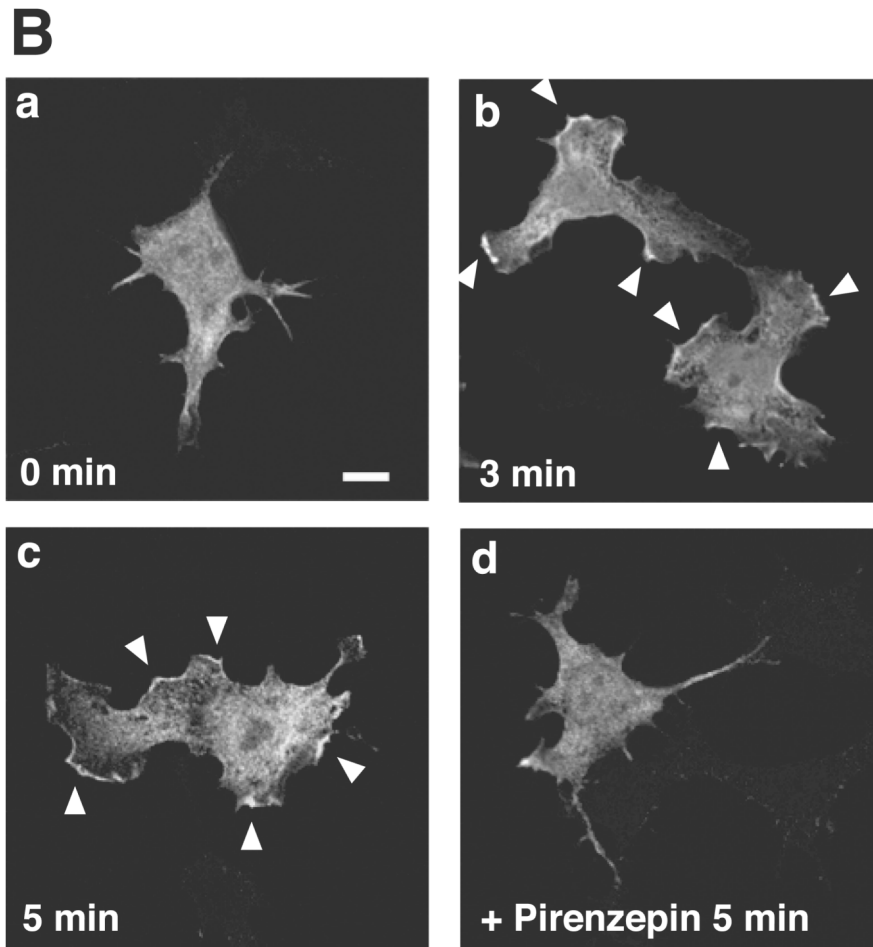
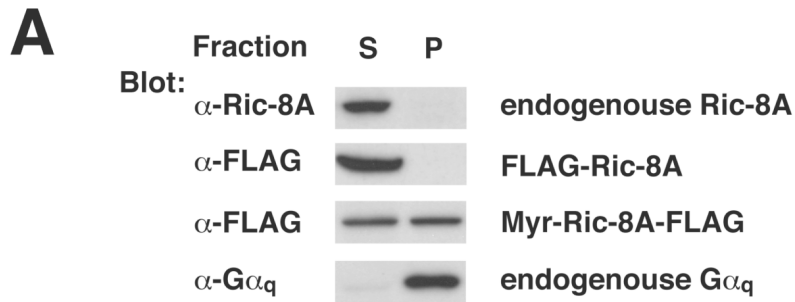


図 1-5 293T 細胞における Ric-8A の細胞内局在

A) 細胞分画。FLAG-Ric-8A もしくは Myr-Ric-8A-FLAG をトランスフェクションした 293T 細胞から細胞抽出液を調製した後、細胞質画分 (S) と膜画分 (P) に分離した。各画分における内在性 Ric-8A の発現は抗 Ric-8A 抗体、内在性 G α_q の発現は抗 G α_q 抗体、過剰発現した FLAG-Ric-8A と Myr-Ric-8A-FLAG の発現は抗 FLAG 抗体を用いて検出した。

B) 共焦点顕微鏡を用いた免疫染色像。293T 細胞に FLAG-Ric-8A と m1 muscarinic acetylcholine 受容体をトランスフェクションした。細胞を 10 μ M pirenzepin で 5 分前処理 (d) した後、10 μ M carbachol で 3 分間 (b)、5 分間 (c, d) 刺激した。細胞を固定した後、抗 FLAG 抗体と Alexa 488 結合抗マウス抗体で染色した。矢頭は FLAG-Ric-8A が局在している細胞膜領域を示す。スケールバーは 10 μ m。

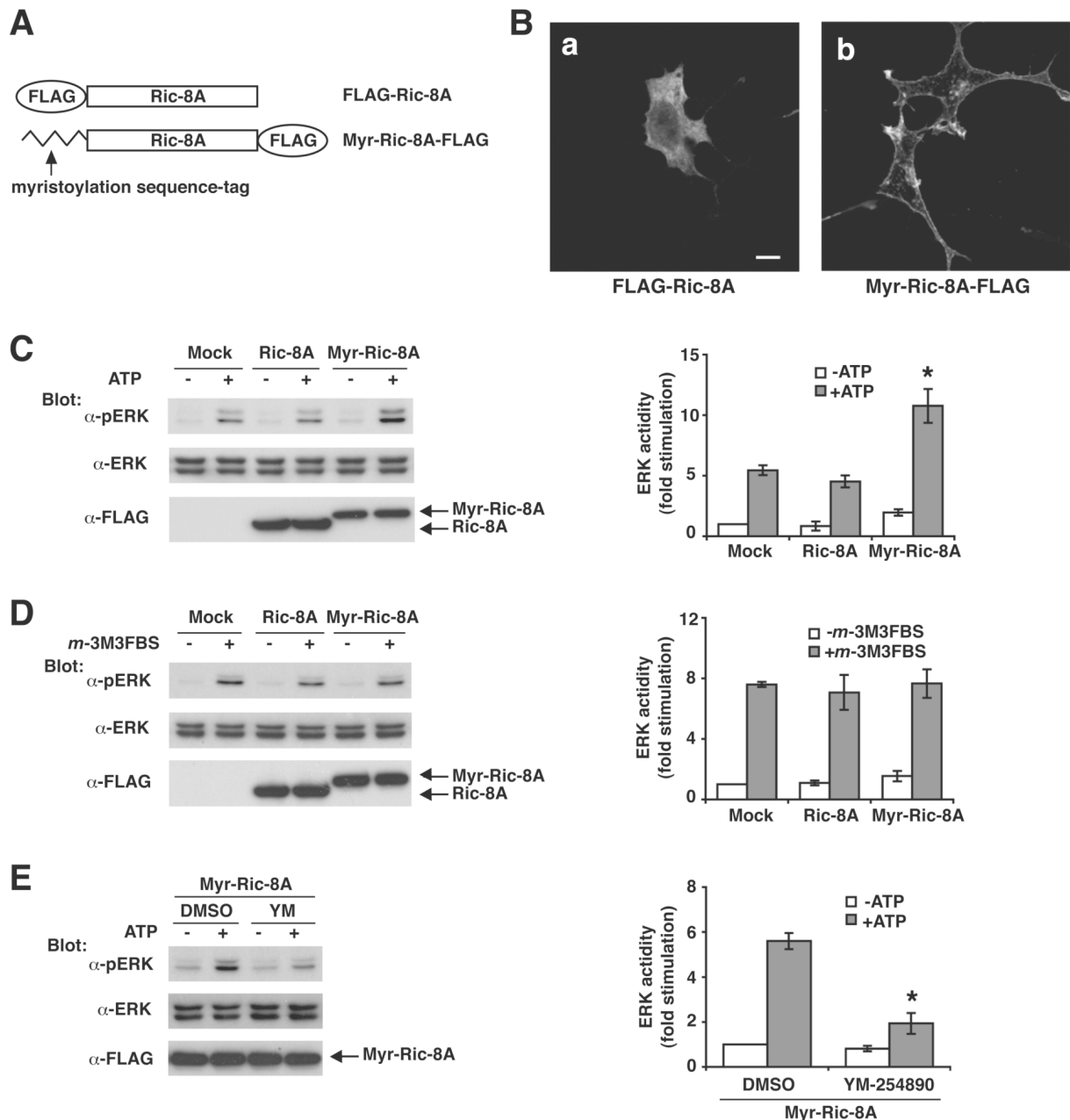


図 1-6 膜局在型 Ric-8A 変異体が ATP 刺激による ERK の活性化に及ぼす効果

A) 野生型 Ric-8A とミリストイル化シグナル融合 Ric-8A 変異体 (Myr-Ric-8A) の構造。

B) 免疫染色。FLAG-Ric-8A (a)、Myr-Ric-8A-FLAG (b) をトランスフェクションした 293T 細胞を固定した後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫染色を行った。

C、D) FLAG-Ric-8A もしくは Myr-Ric-8A-FLAG をトランスフェクションした 293T 細胞を (C) 100 μ M ATP、(D) 100 μ M *m*-3M3FBS で 5 分間刺激した。ERK の活性化は抗リン酸化 ERK 抗体を用いたウエスタンブロットから解析した。

E) Myr-Ric-8A-FLAG をトランスフェクションした 293T 細胞を DMSO もしくは 10 μ M YM-254890 (YM) で 10 分間前処理した後、100 μ M ATP で 5 分間刺激した。

各右グラフのそれぞれの値は 4 回の独立した実験からの平均値と標準偏差を示す。* $P < 0.01$ 。スケールバーは 10 μ M。

1-4 考察

$G\alpha$ の GTPases サイクルは、主に 3 種類の制御因子 GEF、GAP と GDI によって制御されている。GPCR はリガンド結合依存的に $G\alpha$ の GDP/GTP 交換を促進するリガンド依存的 GEF である。RGS は $G\alpha$ の GTPase 活性を促進することで GAP として機能する。一方、 $G\beta\gamma$ は $G\alpha$ からの GDP 解離を阻害する GDI として機能する。近年、 $G\alpha$ の制御因子として機能しうる分子がいくつか見つかっており、これら新しい制御分子もさまざまな生理条件下において G 蛋白質シグナルの制御に関与していると考えられる。当研究室において G_q シグナルの新たな制御分子を発見するために $G\alpha_q$ をベイトとした酵母 Two-hybrid を行い、Ric-8A が同定された。私はまず Ric-8A は N 末側領域で $G\alpha_q$ と結合するが、GEF 活性を保持するには C 末領域部分が必要であることを明らかにした (図 1-1)。

Ric-8A は GPCR と同様に $G\alpha$ に対して GEF 活性を持っているが、その機能には大きな違いが存在する。GPCR は $G\beta\gamma$ と結合した三量体 $G\alpha\beta\gamma$ に対して GEF 活性を示すのに対して、Ric-8A は単量体 $G\alpha$ に対してのみ GEF として機能し、その機能は $G\beta\gamma$ の存在により阻害される (Tall *et al.*, 2003)。 $G\alpha$ は通常 $G\beta\gamma$ と結合した三量体 $G\alpha\beta\gamma$ の状態で存在しているために、Ric-8A は GPCR とは違って、G 蛋白質シグナルの活性化を引き起こすことは出来ず、別のところで機能していると考えられる。本研究で私は、Ric-8A が GPCR によって活性化された G_q シグナルを促進する働きを示すことを以下の実験から明らかにした。まず、siRNA による Ric-8A の発現抑制によって G_q を介した細胞内カルシウム上昇、ERK の活性化が抑制された (図 1-3、1-4)。そして、膜結合型 Ric-8A の過剰発現は G_q 共役型受容体を介した ERK の活性化を促進した (図 1-6)。これらの結果は Ric-8A が細胞膜において G_q 共役型受容体を介したシグナルをポジティブに制御するシグナル増幅因子として機能していることを示唆している。Ric-8A による G_q シグナル増幅の予想モデルとしては、まず 1) リガンド刺激により GPCR が活性化されることにより、 $G\alpha$ の GDP/GTP 交換反応が誘導され $G\alpha$ -GTP と $G\beta\gamma$ に解離する。2) $G\alpha$ -GTP と $G\beta\gamma$ はそれぞれの下流エフェクターにシグナルを伝達し、その後 3) $G\alpha$ は自身のもつ GTPase 活性により $G\alpha$ -GDP に変わる。 $G\alpha$ -GDP と $G\beta\gamma$ が再結合するとそこで反応は終了するが、 $G\beta\gamma$ より先に細胞膜で Ric-8A と結合すると、4) Ric-8A の GEF 活性により $G\alpha$ は再活性化され、再度エフェクターにシグナルを伝達し、シグナルの増幅が起こると考えられる (図 1-7)。

Ric-8A は $G\alpha_q$ (G_q サブファミリー)、 $G\alpha_{11}$ と $G\alpha_o$ (G_i サブファミリー) に対して GEF 活性を持っているが、 $G\alpha_s$ (G_s サブファミリー) には GEF 活性を持っていないことが報告されている (Tall *et al.*, 2003)。今回、Ric-8A による GPCR シグナルの促進効果にどの $G\alpha$ が関与しているのかを明らかにするために、 $G_{q/11}$ 特異的阻害剤 YM-254890

を用いた。Ric-8A の発現抑制で阻害効果が見られた ATP 刺激による ERK の活性化、ET-1 刺激による細胞内カルシウム上昇は共に YM-254890 処理により阻害された (図 1-3 B、図 1-4 A)。さらに膜結合型 Ric-8A による G_q シグナルの促進効果も YM-254890 によりキャンセルされたことから (図 1-6 E)、Ric-8A による GPCR シグナルの促進効果には $G\alpha_q$ が関与していると考えられる。一方、Ric-8A は *in vitro* において $G\alpha_{ii}$ に対しても GEF 活性を示すことから、 G_q 共役型受容体と同様に G_i 共役型受容体を介したシグナルにも関与していると考えられる。 G_i 共役型の m2 muscarinic acetylcholine 受容体を過剰発現した 293T 細胞においても、Ric-8A の発現抑制によって G_i を介した ERK の活性化が減弱することを明らかにしている (データ未発表)。また、Malik らも CHO 細胞において G_i 共役型受容体を介した ERK の活性化が Ric-8A の過剰発現により促進されることを報告している (Malik *et al.*, 2005)。さらに Von Dannecker らは Ric-8B が G_s サブファミリーである $G\alpha_{off}$ と結合し、 $G\alpha_{off}$ 依存的な cAMP 産生を促進することを報告している (Von Dannecker *et al.*, 2005)。これらの結果から、哺乳動物において Ric-8 ファミリー蛋白質は GPCR 下流で G 蛋白質シグナルをポジティブに制御する働きを担っていると思われる。

細胞分画と免疫染色の結果から、無刺激状態において Ric-8A は細胞質に存在していることが明らかとなった (図 1-5)。一方、G 蛋白質は細胞膜に局在していることから、定常状態において Ric-8A と $G\alpha$ は結合していないと考えられる。Carbachol 刺激依存的に Ric-8A の細胞質から細胞膜への局在変化が観測され、さらに膜移行シグナルを付加した Ric-8A 変異体を過剰発現することで G_q シグナルの活性化が促進されたことから、Ric-8A の膜移行が G 蛋白質シグナルの増幅効果に重要であると考えられる。別の G 蛋白質制御因子である RGS においても、膜移行がその機能に重要であることが示されている。RGS2、RGS4 や RGS8 は恒常活性型 $G\alpha$ 変異体の共発現により細胞膜に局在し (Druey *et al.*, 1998; Heximer *et al.*, 2001; Masuho *et al.*, 2004)、また RGS3 は Human mesangial 細胞において ET-1 刺激に応じて細胞膜に移行する (Dulin *et al.*, 1999)。これらの RGS は N 末付近に 33 アミノ酸からなる両親媒性 α ヘリックスを持ち、これを介して細胞膜脂質に結合する (Bernstein *et al.*, 2000)。RGS4 は両親媒性 α ヘリックスに加え、Cys² と Cys¹² のパルミトイル化が膜移行に関与することが報告されている (Srinivasa *et al.*, 1998)。これらとは別に RGS7 や RGS9-1 は膜貫通型のアンカー蛋白質 (R7BP、R9AP) との相互作用を介して膜移行が制御されている (Drenan *et al.*, 2005; Hu and Wensel, 2002)。Ric-8A の膜移行のメカニズムについては全くわかっていないが、両親媒性 α ヘリックス、脂質修飾部位や膜結合ドメインといった領域は配列上からは見つからない。また $G\alpha$ 以外の相互作用分子も報告されていないことから、今後 Ric-8A の膜移行や自身の活性制御のメカニズムを理解していく上で Ric-8A 相互作用分子を同定することが重要な課題であると考えられる。

G 蛋白質はさまざまな生理現象に関与している。G 蛋白質制御分子もまた G 蛋白質の関わる多数の生理現象に関与することがノックアウトマウスを中心とした解析から近年明らかにされつつある (Hollinger and Hepler, 2002)。Ric-8A ノックアウトマウスは原腸陥入時に死亡し (Tonissoo *et al.*, 2006)、また、ショウジョウバエにおいても RIC-8 の欠失によって原腸陥入に異常が生じることが報告されている (Hampoelz *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005)。原腸陥入は上皮細胞のある一群が細胞表面の収縮と移動を行うことにより胚の内側へと陥入する現象であり、近年、原腸陥入時の細胞運動制御に G 蛋白質が関与することがショウジョウバエやゼブラフィッシュを用いた研究から明らかにされつつある (Lin *et al.*, 2005)。これらの研究が発展していくことにより、Ric-8A と G 蛋白質シグナルの関わりについて新たな知見が得られるものと期待される。

G_q 共役型受容体の活性化による Ric-8A の膜移行において、Ric-8A は細胞膜均一に分布するのではなく、特定の膜領域に強く分布していた (図 1-5 B)。Ric-8A は細胞膜の特定部分に局在することで、その領域で G 蛋白質シグナルを増幅していると示唆される。G 蛋白質シグナルを局所的に増幅することは細胞遊走時に重要な働きを持つと考えられる。原腸陥入時のみならず細胞運動制御は G 蛋白質の重要な生理現象の 1 つであり、特に、好中球の細胞遊走における G 蛋白質の役割が詳しく調べられている。好中球は誘引物質の濃度勾配に従って極性を形成し、誘引物質に向かって遊走する (Van Haastert and Devreotes, 2004)。この時、好中球の細胞膜に分布する GPCR と G 蛋白質の分布は均一であるにもかかわらず (Servant *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2000)、好中球は細胞前後にできる 1%程度のわずかな誘引物質の濃度差にも反応して (Zigmond, 1977)、PtdIns(3,4,5)P₃、低分子量 GTPase やアクチンといった下流シグナル分子の活性は劇的に非対称化する (Gardiner *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2002)。このためには GPCR 下流でシグナルの非対称化を促進する機構が重要であると考えられる。Ric-8A が細胞先端部に局在することによってシグナルの増幅を担っていることが予想される。また、これまでに G 蛋白質シグナルの負の制御因子である RGS が細胞遊走制御に関与することが報告されている (Reif and Cyster, 2000; Shi *et al.*, 2002)。Ric-8A が G 蛋白質シグナルの非対称性を生み出す役割を果たしているかは、非常に興味深い今後の課題である。

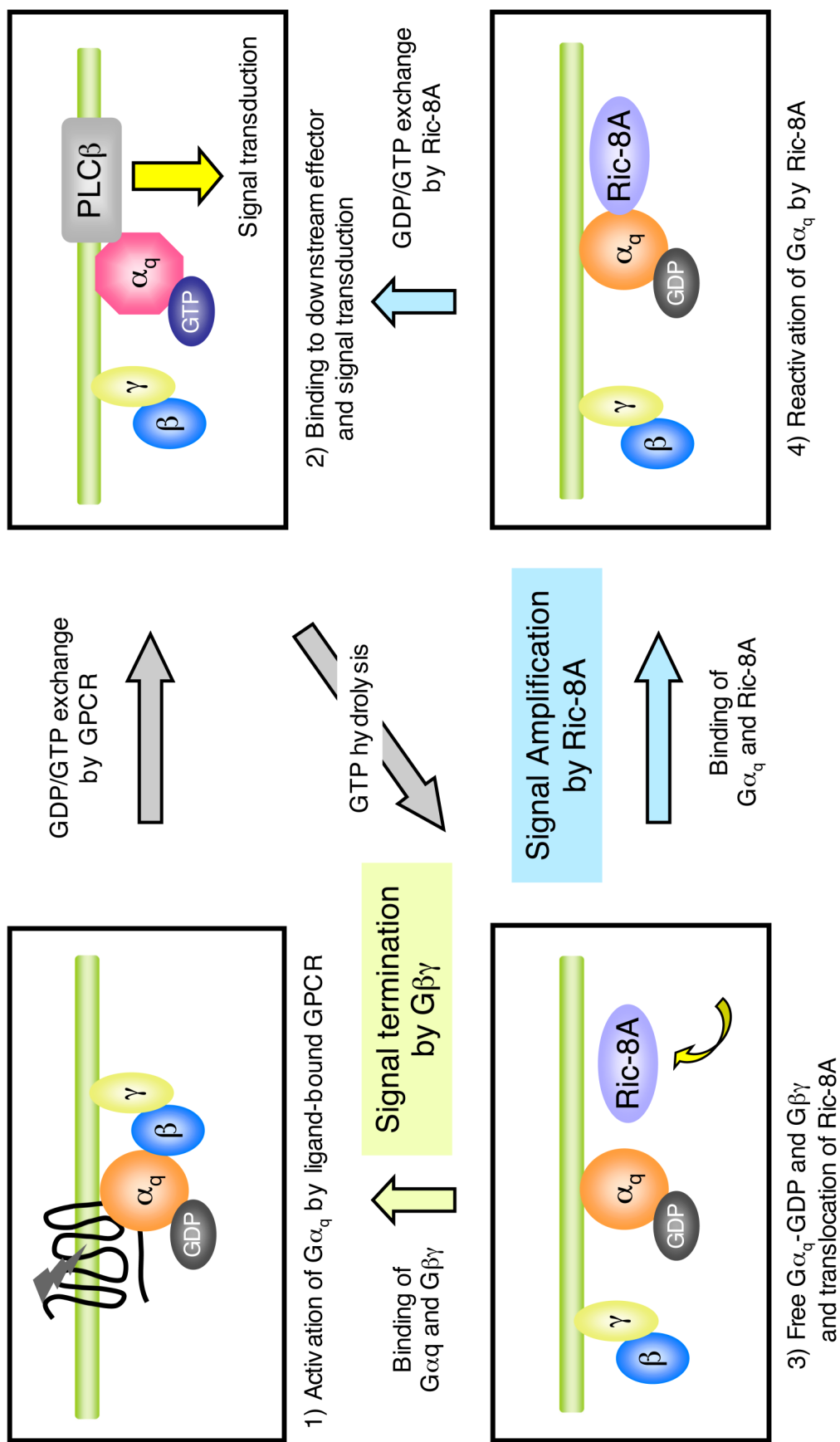


図1-7 Ric-8AのG蛋白質シグナル増幅モデル

この予想モデルの説明に関しては本文中に記載した。

第二章 G_q シグナル阻害活性を示す環状デプシペプチド YM-254890 の作用機構の解析

2-1 序論

外来性微生物由来の細菌毒素の中には、GTP 結合蛋白質を標的として機能しているものが存在する。その中で $G\alpha$ に作用する代表的な毒素が、コレラ菌由来のコレラ毒素と百日咳菌由来の百日咳毒素である。コレラ毒素と百日咳毒素は共に ADP リボース転移酵素として機能しており、 NAD^+ の ADP リボシル基を共有結合させることで $G\alpha$ を修飾する。ただし、両毒素の $G\alpha$ 修飾部位の特異性は異なっており、 $G\alpha$ の GTPase サイクルに及ぼす効果も異なる。コレラ毒素は、 $G\alpha_s$ の Arg²¹⁰ に ADP リボースを共有結合させる。この修飾により GTPase 活性は阻害され、 $G\alpha_s$ は恒常的に活性化した状態になる (Cassel and Pfeuffer, 1978; Freissmuth and Gilman, 1989)。一方、百日咳毒素は $G\alpha_i$ の C 末端から 4 番目に位置するシステインを ADP リボシル化する。この修飾により $G\alpha_i$ と GPCR の相互作用が阻害され、結果として G_i 共役型受容体を介したシグナルが阻害される (Katada and Ui, 1982)。これら外来性 G 蛋白質制御分子の作用機構の解析からも G 蛋白質の機能について多くのことが明らかになった。コレラ毒素によって ADP リボシル化される $G\alpha_s$ の Arg²¹⁰ は GTP の γ リン酸基の近傍に位置しており、GTPase 活性に重要で、アミノ酸置換によっても恒常活性型 $G\alpha_s$ に変化する (Kleuss *et al.*, 1994)。また、 $G\alpha$ の C 末端部分は GPCR の $G\alpha$ 特異性を決定している (Akhter *et al.*, 1998)。さらにこれら細菌毒素は細胞内へ移行することから、特定のシグナル伝達経路に G 蛋白質 (G_s , G_i) が介在することを立証する為の研究ツールとして、現在幅広く使用されている。

YM-254890 は、ADP により誘発される血小板凝集作用を阻害する化合物として *Chromobacterium* QS3666 株の培養液中から単離された環状デプシペプチドである (図 2-1)。プリンヌクレオチドを介して血小板凝集に至るシグナル経路としては、イオンチャネル型 P2X 受容体、 G_q 共役型 P2Y₁ 受容体、そして G_i 共役型 P2Y₁₂ 受容体を介する 3 つの経路が知られており、この内 YM-254890 は P2Y₁ 受容体を介したシグナルを特異的に阻害することが明らかにされた (Taniguchi *et al.*, 2003)。さらに、YM-254890 は P2Y₁ 受容体だけでなく別の G_q 共役型受容体を介した細胞応答、たとえば細胞内カルシウム濃度上昇、血清応答配列 (SRE) を介した転写活性化、も阻害したことから、 G_q シグナル特異的な阻害剤として機能することが示された (Takasaki *et al.*, 2004)。YM-254890 は G_q シグナル経路を特異的に阻害する初めての膜透過性低分子化合物であり、 G_q シグナル経路を解析する上で有益な研究ツールに成りうると期待される。また、YM-254890 は *in vivo* 動物モデルにおいて抗血栓作用と血栓溶解作用を示すこと

が報告されており (Kawasaki *et al.*, 2003)、 G_q の関与する動脈系血栓性疾患の治療薬としての臨床研究が現在進められている。YM-254890 は CHO 細胞膜標品において GPCR 活性化依存的な $G\alpha_q\beta\gamma$ への $GTP\gamma S$ 結合を阻害することから (Takasaki *et al.*, 2004)、 $G\alpha_q$ の GTPase サイクルの活性化段階を阻害することが示唆されていたが、その詳細な作用機構についてはほとんど明らかにされていなかった。本章では、まず YM-254890 が $G\alpha_q$ の GTPase サイクルのどの段階に影響を与えているのかを生化学的解析から検証した。さらに変異体解析とコンピュータシミュレーションから両者の推定結合モデルを構築することにより、YM-254890 の作用機構について考察した。

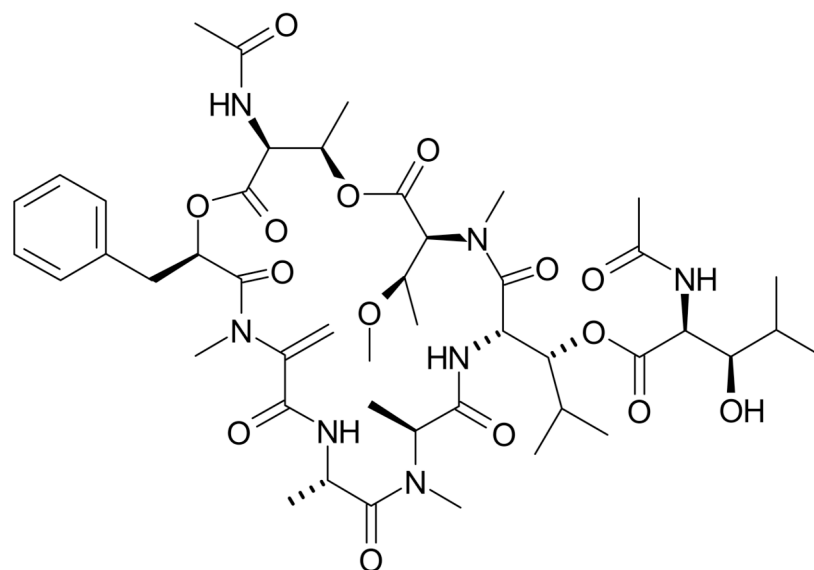


図 2-1 YM-254890 の化学構造

分子量 960。2 つの β -hydroxyisoleucine、*N,O*-dimethylthreonine、threonine、alanine、*N*-methyldehydroalanine、*N*-methylalanine から成る 7 つのアミノ酸の環状構造に 3-phenyllactic acid、acetyl 基と propionyl 基を付加した構造を持つ。

2-2 材料と方法

発現ベクターの構築

ヒト G_q と G_{i16} をコードする cDNA は、HEK293T 細胞と Jurkat 細胞から調製した mRNA から RT-PCR で増幅させ、哺乳動物細胞発現ベクター pCMV5 に組み込んだ。 G_q と G_{i16} の活性型変異体 (G_q R183C, G_{i16} R186C) は Site-directed PCR 変異導入法を用いて作製した。 G_q の各点変異体 (V182S, I190N, Y192A, P193C, D195S, L196V, I200N) も同様に Site-directed PCR 変異導入法を用いて作製した。 G_q と G_{i16} のキメラ変異体 ($G_{q/i16-1, -2, -3, -4, -5, -SWI_{i16}, -SWIII_{i16}, -SWI_q}$) は Overlapping PCR 法を用いて作製した。 $G_{i/q}$ キメラ変異体は既報を基に作製し (Tesmer *et al.*, 2005)、pCMV5 とバキュロウイルス作製ベクター pFastBacHTa に組み込んだ。マウス Ric-8A は N 末 GST タグ、Thrombin 切断配列を融合して pFastBac に組み込んだ。

組換えタンパク質の精製

GST-Ric-8A, His- $G_{i/q}$, His- $G_{i/q}$ I190N 発現バキュロウイルスは Bac-to-Bac バキュロウイルス発現システム (Invitrogen) を用いて作製した。 G_q , G_{i13} , $G\beta_1$, His- $G\gamma_2$ 発現バキュロウイルスはイリノイ大学シカゴ校の小笹徹博士の御好意により頂いた。

G_q と His- $G\beta_1\gamma_2$ は既報に基づいて精製した (Kozasa, 2004)。His- $G_{i/q}$ と His- $G_{i/q}$ I190N の精製は以下の通りに行った。昆虫細胞 Sf9 を Sf-900 II Serum free medium (Invitrogen) を用いて 2×10^6 cells/ml まで浮遊培養した後、His- $G_{i/q}$ もしくは His- $G_{i/q}$ I190N 発現バキュロウイルスを感染させ、さらに 48 時間培養し細胞を回収した。細胞ペレットを Lysis buffer A (20 mM Hepes (pH8.0), 100 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 100 μ M EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol, 50 μ M GDP, and protease inhibitors (16 μ g/ml PMSF, 16 μ g/ml TPCK, 16 μ g/ml TLCK, 3.2 μ g/ml leupeptin, and 3.2 μ g/ml lima bean trypsin inhibitor)) で懸濁した後、ポッターエバンス型ホモジェナイザーを用いて細胞破壊を行った。試料を 100,000 xg で 45 分間超遠心した後、上清を回収し、Buffer A (20 mM Hepes (pH8.0), 100 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM β -mercaptoethanol, 50 μ M GDP, 10 mM imidazol, and protease inhibitors) を用いて終濃度 2 mg/ml に調製し、Ni-NTA agarose (QIAGEN) を詰めたカラムに添加した。カラムを Buffer B (400 mM NaCl, 20 mM imidazol に変更した Buffer A) で洗浄した後、Elution buffer A (150 mM imidazol を含む Buffer A) を用いて溶出を行った。溶出サンプルは Centricon YM-30 で濃縮した後、Buffer C (20 mM Hepes (pH8.0), 100 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 50 μ M GDP, and protease inhibitors) で平衡化した Hi-Load 16/60 Superdex 200 pg gel-filtration column (GE ヘルスケア) に添加してゲル濾過分画を行った。単量体 His- $G_{i/q}$ を含むフラク

ションを回収し、Centricon YM-30 で濃縮して最終標品とした。

GST-Ric-8A の精製は既報を改変して行った (Tall *et al.*, 2003)。GST-Ric-8A 発現バキュロウイルスを *Sf9* 細胞に感染させ、60 時間浮遊培養後に細胞を回収した。細胞ペレットを Lysis buffer B (40 mM Hepes (pH7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, and protease inhibitors) で可溶化した後、100,000 xg で 45 分間遠心して上清を回収した。細胞抽出液のタンパク質濃度を終濃度 2 mg/ml に調製し、Glutathione-Sepharose 4B (GE ヘルスケア) を詰めたカラムに添加した。カラムを Buffer D (20 mM Hepes (pH7.5), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and protease inhibitors) で洗浄した後、Elution buffer B (20 mM Hepes (pH8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM Glutathione, and protease inhibitors) を用いて溶出を行った。溶出サンプルは Centricon YM-30 で濃縮した後、Buffer E (20 mM Hepes (pH8.0), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, and protease inhibitors) で平衡化した Hi-Load 16/60 Superdex 200 pg gel-filtration column に添加してゲル濾過分画を行った。各フラクションを SDS-PAGE で解析した所、GST-Ric-8A はボイドと分子量 160 kDa 付近の 2 カ所のピークに確認されたが、ボイドフラクションから回収した GST-Ric-8A には G_q に対する GEF 活性がほとんど確認できなかった。そこで 160 kDa 付近のピークフラクションからのみ GST-Ric-8A を回収し、Centricon YM-30 で濃縮して最終標品とした。

GTP S 結合実験

精製した G_q の自発的な GTP S 結合活性は filter-binding 法を用いて解析した (Sternweis and Robishaw, 1984)。概略は以下の通りである。100 nM G_q と任意の濃度の YM-254890 を Assay buffer A (50 mM Hepes (pH7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.9 mM $MgSO_4$, and 0.05% Genapol C-100) 中、20°C で 5 分間前処理した。その後、10 μ M [35 S]GTP S (10,000 cpm/pmol) と 300 mM $(NH_4)_2SO_4$ を加えることにより結合反応を開始させた。一方、 G_s 、 G_{i1} と G_o への GTP S の結合は Assay buffer B (20 mM Hepes (pH8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM $MgSO_4$, and 0.05% Lubrol-PX) 中で、 G_{i3} への GTP S の結合は Assay buffer C (20 mM Hepes (pH7.6), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM $MgSO_4$, and 0.05% Lubrol-PX) 中で 10 μ M [35 S]GTP S (10,000 cpm/pmol) を加えることにより行った。 G_{i1} と G_{i3} に関しては 25°C、それ以外の G は 20°C で反応を行った。氷冷した Stop buffer (20 mM Tris (pH7.7), 100 mM NaCl, 2 mM $MgSO_4$, 0.05% Genapol C-100, and 1 mM GTP) を加えて反応を停止させた後、反応液をニトロセルロース膜に通した。その後、膜を氷冷した Wash buffer (20 mM Tris (pH7.7), 100 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$) で 2 回洗浄し、風乾した。 G に取り込まれた GTP S の量は、LS6500 液体シンチレーションカウンター (Beckman) で膜に吸着した 35 S のカウント

を測定することで算出した。

Ric-8A による G_q の GTP S 結合活性は既報に基づいて測定した (Tall *et al.*, 2003)。100 nM G_q と 10 μ M YM-254890 を Assay buffer D (20 mM Hepes (pH8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM $MgSO_4$, and 0.05% Genapol C-100) 中、20°C で 5 分間前処理した。その後、10 μ M [35 S]GTP S (10,000 cpm/pmol) と 200 nM GST-Ric-8A を加えることにより結合反応を開始させた。その後の操作は上記と同様の方法で行った。

ヌクレオチド解離実験

100 nM G_q は 50 mM $(NH_4)_2SO_4$ を含む Assay buffer A 中で、2 μ M [3 H]GDP もしくは 4 μ M [35 S]GTP S と 20°C で 18 時間インキュベーションすることにより、放射ラベルヌクレオチドを結合させた。100 nM G_{11} は Assay buffer B 中で 2 μ M [3 H]GDP と 25°C で 2 時間インキュベーションした。この条件下で、約 25% の G が放射ラベルヌクレオチドを結合した。過剰量の非放射性ヌクレオチド (1 mM GDP もしくは 2 mM GTP S)、任意の濃度の YM-254890 と 750 mM (G_q -GDP 用) もしくは 1150 mM (G_q -GTP S 用) $(NH_4)_2SO_4$ を含む Assay buffer を反応液と当量混ぜ合わせることにより、放射ラベルヌクレオチドの解離を誘導した。氷冷した Wash buffer を加えることにより反応を停止させた後、反応液をニトロセルロース膜に通した。

Trypsin protection アッセイ

まず、50 nM G_q は 0.05% Lubrol-PX を含む Assay buffer E (20 mM Hepes (pH8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM $MgSO_4$, 10 μ M GDP) 中で、 AlF_4^- (10 mM $MgCl_2$, 5 mM NaF, 50 μ M $AlCl_3$) と 25°C で 2 時間インキュベーションすることにより遷移状態への構造変化を誘導した。DMSO もしくは 10 μ M YM-254890 で 30 分間処理した後、終濃度 1 μ g/ml の TPCK-trypsin (Sigma) で 15 分間切断反応を行った。Laemmli sample buffer を加えて反応を停止させた後、SDS-PAGE で展開し、 G_q の C 末部分を認識する抗 $G_{q/11}$ 抗体 (Santa Cruz) を用いたウエスタンブロットにより G_q の切断を確認した。

In vitro 結合実験

50 nM G_q は 0.05% Genapol C-100 を含む Assay buffer E 中、DMSO もしくは 10 μ M YM-254890 で 16°C、1 時間前処理した。ここに 200 nM GST-Ric-8A もしくは 500 nM His- $G\beta_{1\gamma_2}$ を加え 1 時間インキュベーションした後、Glutathione-Sepharose 4B もしくは

Ni-NTA agarose を加えさらに4°Cで1時間ローテートした。レジンを3回洗浄した後、Laemmli sample buffer を加えて溶出を行った。溶出サンプルは Coomassie Blue 染色と抗 G_q 抗体を用いたウエスタンブロットに用いた。

活性化依存的な Gβγ 複合体からの G の解離

まず、293T 細胞に G_q, Gβ₁, FLAG-Gγ₂ をトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後、細胞を 10 μM YM-254890 で30分間前処理し、さらに AlF₄⁻ を加えて2時間インキュベーションした。細胞を PBS で洗浄し、1 μM YM-254890 と AlF₄⁻ を含むもしくは含まない Lysis buffer B で溶解した後、14,000 xg で10分遠心し、上清を細胞抽出液として回収した。細胞抽出液に抗 FLAG 抗体 (Sigma) と Protein G-Sepharose (GE ヘルスケア) を加えて、4°Cで1時間免疫沈降を行った。

ルシフェラーゼアッセイ

293T 細胞を 48-well plate にまき、Lipofectamine2000 を用いて各 G コンストラクト、pSRE-Luc と pEF-RLuc をトランスフェクションした。トランスフェクションする DNA 量は pCMV を用いて 300 ng/well に調整した。トランスフェクション20分後に任意の濃度の YM-254890 を加えて、さらに18時間インキュベーションした。細胞を PBS で洗浄した後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いてレポーター遺伝子の転写活性化を測定した。ホタルルシフェラーゼ活性は、内部標準として導入したウミシイタケルシフェラーゼ活性で補正した。

2-3 結果

1) YM-254890 は GEF による G_q 活性化を阻害する

細胞内において G 蛋白質の活性化は GEF により誘導される。 G_q に対する GEF として機能する分子としては GPCR と Ric-8A が同定されており、この内 YM-254890 は GPCR による G_q の活性化を阻害することがすでに報告されている (Takasaki *et al.*, 2004)。しかしながら、YM-254890 の作用分子が何であるか明らかになっていなかった。そこでまず、Ric-8A による G_q の活性化も YM-254890 により阻害されるかを *in vitro* GTP S 結合実験と相互作用実験により検討した。これまでに報告されているように、GST-Ric-8A は G_q の [35 S]GTP S の取り込みを顕著に促進した。一方、この [35 S]GTP S の取り込みは YM-254890 処理により顕著に阻害された (図 2-2 A)。次に YM-254890 が G_q と Ric-8A の相互作用を阻害するかを検討した。 G_q と GST-Ric-8A を YM-254890 存在化でインキュベーションした後、gultathione-Sepharose を用いて pull-down を行った。その結果、 G_q と GST-Ric-8A の相互作用は YM-254890 処理によって減弱した (図 2-2 B)。これらの結果から、YM-254890 は GEF による G_q の活性化を阻害していることが確かめられた。

2) YM-254890 は G_q の GTP S 結合を直接かつ選択的に阻害する

百日咳毒素や Substance P アナログ GPant-2 などは、GEF と $G\alpha$ の相互作用を直接阻害することで GEF による $G\alpha$ の活性化を阻害している (Mukai *et al.*, 1992)。図 2-2 B で YM-254890 が $G\alpha_q$ と Ric-8A の相互作用を阻害したことから、YM-254890 の作用点の 1 つの可能性として $G\alpha_q$ と GEF の相互作用阻害が考えられた。しかしながら、Ric-8A はヌクレオチドが外れた状態の $G\alpha$ と複合体を形成していることがこれまでに報告されており (Tall *et al.*, 2003)、YM-254890 が $G\alpha_q$ のヌクレオチド交換を直接阻害し、結果として Ric-8A と $G\alpha_q$ の相互作用が阻害されることが考えられた。そこで YM-254890 が $G\alpha_q$ のヌクレオチド交換を直接阻害しているのかを検討する為に、 G_q の自発的な GTP S 結合に対する YM-254890 の効果を調べた。 G_q の自発的なグアニンヌクレオチド交換反応は、他の G とは違って通常の条件下ではほとんど起こらないことが知られている (Helper *et al.*, 1993)。これは精製した G_q では結合した GDP の自発的な解離がほとんど起こらないためと考えられている。そこで、 G_q からの GDP 解離を促進する硫酸アンモニウム (硫安) 存在化で実験を行った (Ferguson *et al.*, 1986)。100 nM G_q を用いて [35 S]GTP S 結合の経時変化を測定したところ、300 mM 硫安存在下において G_q の自発的な [35 S]GTP S 結合が確認された。この結合は 10 μ M YM-254890 の前処理で完全に阻害された (図 2-3 A)。次に YM-254890 の濃度依存的な阻害効果

を検討した。その結果、100 nM G_q の $[^{35}\text{S}]\text{GTP}$ S 結合を阻害する YM-254890 の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) は 26.9 nM であった (図 2-3 B)。さらに他の G の $[^{35}\text{S}]\text{GTP}$ S 結合に対する YM-254890 の効果を検討した。100 nM G_s , G_{11} , G_o もしくは G_{13} を 10 μM YM-254890 で前処理した後、 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}$ S 結合活性を測定した。その結果、YM-254890 はこれら G の $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合能に対しては全く阻害効果を示さなかった (図 2-4)。これらの結果から、YM-254890 は直接かつ選択的に G_q に作用してそのグアニンヌクレオチド交換反応を阻害することが示された。

3) YM-254890 は G_q からの GDP 解離を阻害する

グアニンヌクレオチド交換反応は、1) G に結合している GDP の解離、2) ヌクレオチドフリーの G が新しいヌクレオチドを取り込む、という 2 段階の反応からなっている。YM-254890 がどちらの反応を阻害しているかを明らかにする為に、 G_q からの GDP 解離に対する YM-254890 の効果を検討した。前もって $[^3\text{H}]\text{GDP}$ を取り込ませた G_q を 400 mM 硫酸存在下で過剰量の非放射性 GDP とインキュベーションすることによって、 $[^3\text{H}]\text{GDP}$ の解離を測定した。YM-254890 存在下において、 G_q からの $[^3\text{H}]\text{GDP}$ の解離は完全に阻害された (図 2-5A)。一方、 G_{11} からの $[^3\text{H}]\text{GDP}$ の解離は全く阻害されなかった (図 2-5 C)。次に、 G_q からの $[^3\text{H}]\text{GDP}$ 解離に対する YM-254890 の濃度依存的な阻害効果を検討した。その結果、50 nM G_q からの $[^3\text{H}]\text{GDP}$ 解離を阻害する YM-254890 の IC_{50} は 18.0 nM であった (図 2-5 B)。以上の結果から、YM-254890 が G_q のグアニンヌクレオチド交換を阻害する作用点は $G\alpha_q$ からの GDP 解離であることが明らかになった。

4) YM-254890 は活性型から不活性型への G_q の構造変化を誘導する

これまで、不活性な GDP 型の G_q に対する YM-254890 の効果を検討してきた。そこで次に、YM-254890 は活性型の G_q に対してもなんらかの作用を引き起こすのかを検討した。リン酸アナログである AlF_4 を GDP 型 $G\alpha$ と反応させると、 AlF_4 は GTP の γ 位のリン酸に相当する部分に結合することによって $G\alpha$ のコンホメーション変化を誘導する。 AlF_4 により誘導された G の構造は GTP 加水分解時の遷移状態の構造であり、GTP 型 G の構造と非常に類似している (Tesmer *et al.*, 1997; Sprang 1997)。そこで、遷移状態構造の G_q に YM-254890 を作用させることで G_q の構造に変化が生じるかを検討した。 G の構造変化は Trypsin protection assay で解析した。Trypsin protection assay は、不活性型 G と活性型 G とで Trypsin に対する感受性が異なることを利用して $G\alpha$ の構造を調べる方法である。図 2-6 A に示すように、不活性型 G

はN末部分とスイッチII領域内のアルギニン残基が Trypsin による切断を受けるのに対し、活性型 G_q はスイッチII領域内のアルギニン残基が Trypsin による切断を受けなくなる。その結果、活性型 G_q を Trypsin 処理した場合には全長 42 kDa のうちN末部分が切断された 38 kDa の部分分解産物を生じる (Miller *et al.*, 1988; Lambright *et al.*, 1994)。まず、GDP もしくは AlF_4^- で処理した G_q を Trypsin で切断したところ、 AlF_4^- 処理依存的に部分分解産物が検出された。このことから AlF_4^- 処理により G_q が遷移状態への構造変化をきちんと引き起こしていることが確認された。次に、 AlF_4^- で遷移状態になった G_q を YM-254890 で処理し、Trypsin で切断した。その結果、部分分解産物は検出されなかった (図 2-6 B)。YM-254890 は活性型 G_q に対して、その構造を不活性型に変化させることが示唆された。

5) YM-254890 は G_q からの GTP S の解離を促進する

次に、YM-254890 は GTP 結合型 $G\alpha_q$ に対してその GTP 結合能にどのような影響を与えるのかを [^{35}S]GTP γ S 解離実験から検討した。通常 G_q は GTP と非常に高い親和性を持っているため、 G_q からの GTP 解離はほとんど観測されない (Chidiac *et al.*, 1999)。ヌクレオチドと G_q の親和性を低下させる硫酸を 600 mM 加えても、 G_q からの GTP S 解離は非常にゆっくりであった。驚いたことに、YM-254890 処理によって GTP S の解離は劇的に促進された (図 2-6 C)。このことから、YM-254890 処理により $G\alpha_q$ の GTP に対する親和性が低下することが示された。これまでの結果を考慮すると、YM-254890 は活性型 $G\alpha_q$ に対して不活性型への構造変換を誘導する。そして不活性型構造を安定化することで、 G_q の GDP に対する親和性が高まり、逆に GTP との親和性が低下することが示唆された。

6) YM-254890 は三量体 $G_q\beta\gamma$ の活性化を阻害する

通常、細胞内において不活性型 G_q は単量体ではなく、 $G\beta\gamma$ と結合した三量体の状態で存在している。まず、YM-254890 が G_q と $G\beta\gamma$ の相互作用になんらかの影響を与えるかを検討するために、 G_q と His- $G\beta_1\gamma_2$ を用いた *in vitro* 結合実験を行った。 G_q と His- $G\beta_1\gamma_2$ を YM-254890 存在下もしくは非存在下でインキュベーションした後、Ni-NTA Agarose を用いて pull-down を行った。その結果、YM-254890 は G_q と His- $G\beta_1\gamma_2$ の相互作用には全く影響を与えなかった (図 2-7 A)。

次に、三量体 $G_q\beta\gamma$ の活性化に対する YM-254890 の効果を検討した。精製した三量体 $G_q\beta\gamma$ の組み合わせには His- $G_{i,q}$ 、 $G\beta_1$ と His- $G\gamma_2$ CS を用いた。 G_q は N 末領域でパルミトイル化を受けることにより細胞膜に局在するが、His- $G_{i,q}$ は N 末 32 アミ

ノ酸部分を G_{11} と組み換えることで脂質修飾を受けなくなっている。また、 $G_{\gamma_2}CS$ は C 末のゲラニルゲラニル化を受ける Cys を Ser に変えた変異体である。これらを *Sf9* 細胞に発現させると細胞質画分で His- G_{i_q} 、 $G\beta_1$ と His- $G_{\gamma_2}CS$ が複合体を作るため、膜画分に存在する *Sf9* 由来の G 蛋白質がコンタミすることがなく、非常に高純度で精製出来ることが報告されている (Tesmer *et al.*, 2005)。一方、従来の G_q を精製する G_q 、 $G\beta_1$ 、His- G_{γ_2} の組み合わせでは、*Sf9* 由来 $G_{i\text{-like}}$ が His- $G\beta\gamma$ と三量体を形成し精製サンプルに混入することが知られている (Kozasa, 2004)。まず、精製した His- G_{i_q} が G_q と同様な YM-254890 感受性を示すことを GTP S 結合実験により確認した。 $[^{35}S]GTP S$ 結合を阻害する YM-254890 の IC_{50} は、100 nM His- G_{i_q} の場合 23.9 nM であり (図 2-9 F の黒丸)、100 nM G_q の 26.9 nM (図 2-3 B) とほぼ同じであった。そこで次に、三量体 His- $G_{i_q}\beta\gamma CS$ の GTP S 結合に対する YM-254890 の効果を検討した。その結果、 $G\alpha$ 単独の時と同様に三量体 His- $G_{i_q}\beta\gamma CS$ の GTP S 結合は YM-254890 により阻害された (図 2-7 B)。

三量体 $G_q\beta\gamma$ の活性化に対する YM-254890 の効果についてさらなる検討を行った。三量体 $G\beta\gamma$ を AlF_4^- で処理すると、 G のコンホメーション変化が誘導されて $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ が解離する。そこで、 AlF_4^- による G と $G\beta\gamma$ の解離を YM-254890 が阻害できるかを検討した。293T 細胞に G_q 、 $G\beta_1$ 、FLAG- G_{γ_2} を共発現させた後、YM-254890 存在下、もしくは非存在下において AlF_4^- 処理を行った。細胞抽出液を調製した後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行うことにより、FLAG- $G\beta\gamma$ と共沈してきた G_q を検出した。その結果、 AlF_4^- 処理により誘導される G_q と $G\beta\gamma$ の解離は YM-254890 存在下において抑制された。一方、YM-254890 は G_{11} と $G\beta\gamma$ の解離は全く阻害しなかった (図 2-7 C)。以上の結果から、YM-254890 は単量体 G_q だけでなく、三量体 $G_q\beta\gamma$ に対しても阻害効果を持つことが示された。

7) YM-254890 の G_q サブファミリー内での特異性とドッキングシミュレーションを用いた G_q 結合部位の探索

ヒトには G_q サブファミリーとして $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{11}$ 、 $G\alpha_{14}$ と $G\alpha_{16}$ が存在している。そこで、 G_q サブファミリー内での YM-254890 の特異性を検討した。現在までのところ、 G_{16} は組み換え蛋白質としては精製できていないことから (Hepler *et al.*, 1994)、 AlF_4^- 処理により誘導される G_{16} と $G\beta\gamma$ の解離を YM-254890 が阻害するかで G_{16} の YM-254890 感受性を検討した。その結果、YM-254890 存在下においても AlF_4^- 依存的な G_{16} と $G\beta\gamma$ の解離が確認されたことから (図 2-7 C)、YM-254890 は G_{16} には作用しないことが示された。また、YM-254890 は G_{11} と G_{14} には作用するが、 G_{16} のマウスホモログである G_{15} には作用しないことが共同研究者であるアステラス製薬の

高崎淳博士により調べられている（未発表データ）。YM-254890 の G_{α} 特異性を決める分子基盤を明らかにするために、まず共同研究者であるアステラス製薬の折田正弥博士によるドッキングシュミレーションによって予想された YM-254890 と G_{α_q} の結合モデル（モデル 1）を検討した。 G_{α_q} の立体構造は明らかとされていなかったことから、既知である $G_{\alpha_{it}}$ の立体構造（PDB 番号: 1GOT）からアミノ酸を置換することにより G_{α_q} の構造を推定した。同様に YM-254890 の立体構造も、構造が類似した化合物である FR900359 の立体構造からモデリングされた。 G_{α} は Ras-like GTPase ドメイン（図 2-8 A 灰色）と Helical ドメイン（桃色）から構成されており、この 2 つのドメインの間に挟まる形でヌクレオチド（オレンジ）が結合している。また、Ras-like GTPase ドメインには GDP 結合時と GTP 結合時とでコンホメーションが変化する 3 つのスイッチ領域（スイッチ I: 黄緑、スイッチ II: 黄色、スイッチ III: 水色）が存在する。モデル 1 では、YM-254890（青）は 3 つのスイッチ領域で囲まれた部分に入り込んでいた。また、このモデルにおける G_{α_q} と YM-254890 の結合様式を解析したところ、YM-254890 は G_{α_q} の Thr⁴⁷、Arg²¹⁰、Arg²¹³、Glu²⁴¹ の側鎖との間で水素結合を形成していた（図 2-8 B）。次にこれらアミノ酸部位の保存性を検討するために、各 G_{α} 間でマルチプルアライメントを行った。スイッチ II 領域内の Arg²¹⁰、Arg²¹³、スイッチ III 領域内の Glu²⁴¹ は各 G_{α} 間で保存されていたのに対し、Thr⁴⁷ は YM-254890 感受性である G_{α_q} 、 $G_{\alpha_{11}}$ と $G_{\alpha_{14}}$ でのみ保存されていた（図 2-8 C）。Thr⁴⁷ が YM-254890 の G_{α} 特異性に重要であるかを検討するために Thr を Ala に置換した変異体（ G_{α_q} T47A）を作製し、YM-254890 感受性を検討することにした。 G_{α_q} R183C 変異体（ G_{α_q} RC）は恒常活性型変異体で、293T 細胞に過剰発現させると血清応答配列（SRE）を介する転写が活性化される。そこで SRE 下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトを用いることで、ルシフェラーゼ量を G_{α_q} の活性化の指標とした実験を行った。 G_{α_q} RC の活性は YM-254890 の濃度依存的に阻害された。また、 G_{α_q} T47A-RC の活性も G_{α_q} RC と同様に阻害されたことから（図 2-8 D）、Thr⁴⁷ は YM-254890 感受性には関与しないことが明らかとなった。

8) G_{α_q} のスイッチ I 領域は YM-254890 感受性に関与している

ドッキングシュミレーションから予想された G_{α_q} と YM-254890 の結合モデル 1 について、その妥当性を証明する実験的裏付けが得られなかった。そこで、YM-254890 感受性の G_{α_q} と非感受性の $G_{\alpha_{16}}$ との間でアミノ酸配列を組み換えたキメラ蛋白質（ $G_{\alpha_{q/16}}$ および $G_{\alpha_{q/16}}$ RC）を作製することにより、YM-254890 感受性に関与する G_{α} の構造領域の同定を試みた。各 $G_{\alpha_{q/16}}$ の YM-254890 感受性は、RC 変異体の過剰発現による SRE 転写活性化を指標にして検討した。作製した $G_{\alpha_{q/16}}$ のコンストラクトと

SRE 転写活性を図 2-9 A, B に示した。Helical ドメインに入るまでの N 末領域、Helical ドメイン、またはスイッチ領域以降の C 末領域を G_{16} 由来の配列に組み換えた $G_{q/16}$ ($G_{q/16-2, -3, -4}$) はすべて $5 \mu\text{M}$ YM-254890 処理により SRE 転写活性が阻害されたことから、YM-254890 感受性を保っていることが示された。 $G_{q/16-1, -5}$ の結果も考慮して、スイッチ領域が YM-254890 感受性に重要であることが示唆された。そこで、3 つのスイッチ領域のうち、スイッチ I とスイッチ III をそれぞれ $G\alpha_{16}$ 由来の配列に組み換えた $G_{q/16}$ ($G_{q/16-SWI_{16}}$ と $G_{q/16-SWIII_{16}}$) の YM-254890 感受性を検討した。なお、スイッチ II は各 G 間でアミノ酸保存性が非常に高く、YM-254890 非感受性の G_{15} が G_q とアミノ酸配列が完全に一致していたためスイッチ II を組み換えた $G_{q/16}$ は作製しなかった。その結果、 $G_{q/16-SWI_{16}}$ では YM-254890 感受性が失われていた。一方、 $G_{q/16-SWIII_{16}}$ は YM-254890 感受性を保っていた。次に、 $G\alpha_{16}$ に $G\alpha_q$ 由来のスイッチ I 領域を組み込むことで YM-254890 感受性が生まれるかを検討した。まずは全長 $G\alpha_{16}$ の内スイッチ I 領域のみを $G\alpha_q$ 由来の配列に組み換えた $G_{q/16}$ キメラを作製したが、この $G_{q/16}$ キメラは活性自体を失っていた (データ未発表)。そこで Helical ドメインに入るまでの N 末領域を同時に $G\alpha_q$ 由来の配列に組み換えた $G\alpha_{q/16-SWI_q}$ を作製したところ、この $G_{q/16}$ キメラは活性を保持していた。 $G\alpha_{q/16-SWI_q}$ の YM-254890 感受性を検討したところ、 $G\alpha_{q/16-SWI_q}$ による SRE の活性化は $5 \mu\text{M}$ YM-254890 処理によって 7 割抑制された。この結果から、 $G\alpha_{q/16-SWI_q}$ が YM-254890 感受性を獲得したことが明らかとなった。以上の結果から、スイッチ I 領域が YM-254890 感受性に関与していることが示された。

次に YM-254890 感受性に関与する $G\alpha_q$ のアミノ酸を同定するために、 $G_{q/16-SWI_{16}}$ でアミノ酸配列を組み換えた領域について、各 G 間でマルチプルアライメントを行った。その結果、YM-254890 感受性の G_q 、 G_{11} と G_{14} でのみ保存されたアミノ酸が 6 つあることを見出した (図 2-9 C)。そこで各アミノ酸残基を G_{16} 由来のものに置換した変異体 G_q および $G_q\text{RC}$ (V182S、I190N、P193C、D195S、L196V と I200N) を作製し、各変異体過剰発現による SRE 転写活性化に対する YM-254890 の濃度依存的阻害効果を検討した。 $G_q\text{RC}$ に対する YM-254890 の IC_{50} は $3.23 \pm 1.10 \text{ nM}$ であった。一方、I190N に対する IC_{50} は $145.1 \pm 11.2 \text{ nM}$ で、YM-254890 感受性が 40 倍低下することがわかった。さらに V182S と P193C を用いた場合にも IC_{50} が若干上昇していた (V182S: 7.24 ± 1.06 、P193C: 13.52 ± 1.06)。I190N 変異が G_q の YM-254890 感受性に関与しているかをさらに検討するために、I190N 変異をもった His- G_{iq} (His- G_{iq} I190N) 発現バキュロウイルスを構築し、*Sf9* に感染させ、そこから His- G_{iq} I190N 蛋白質を精製した。まず、His- G_{iq} I190N の GTP S 結合能について検討した。図 2-9 E に示すように His- G_{iq} I190N の $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ 結合量の経時変化は His- G_{iq} とほぼ同じであった。よって、I190N 変異は G_q の GTP S 結合能自体には

影響を与えていないことが示された。次に His-G_{i/q} と His-G_{i/q}I190N の³⁵S]GTP S 結合に対する YM-254890 の濃度依存的な阻害効果を検討した。その結果、His-G_{i/q} に対する YM-254890 の IC₅₀ は 23.9 ± 6.47 nM、ヒル係数 (Hill coefficient) は -2.14 ± 0.22 であったのに対して、His-G_{i/q}I190N に対する YM-254890 の IC₅₀ は 107 ± 5.95 nM、ヒル係数は -0.93 ± 0.12 であった (図 2-9 F)。I190N 変異が G_q の YM-254890 感受性に影響を与えることが精製蛋白質を用いた実験系においても証明された。以上の結果から、G_q のスイッチ I 領域、特に Ile¹⁹⁰ が G_q と YM-254890 の相互作用に関与していることが示唆された。

9) G_q-YM-254890 結合モデルの提唱

キメラ G_{q16} と G_q 点変異体を用いた解析結果を参考に、ドッキングシュミレーションによる新しい G_q-YM-254890 結合モデル (モデル 2) を折田正弥博士に構築していただいた。モデル 2 において、YM-254890 (図 2-10 A 赤) は G_q 分子の外側からスイッチ I 領域に結合している。モデル 2 での G_q と YM-254890 の結合様式を解析したところ、YM-254890 は G_q と水素結合を 2 つ形成していることが示唆された。1 つは Tyr¹⁹² の側鎖で、もう 1 つは Glu¹⁹¹ のポリペプチド鎖であった (図 2-10 B)。そこで Tyr¹⁹² が YM-254890 との結合に関与しているかを明らかにするために、Tyr¹⁹² を Ala に置換した G_q 変異体 (Y192A) を作製し、Y192A による SRE 転写活性化に対する YM-254890 の濃度依存的阻害効果を検討した。その結果、Y192A は G_q よりも YM-254890 感受性が 15 倍低下していることが明らかとなった (図 2-10 C)。YM-254890 との間で水素結合を形成していると予想された G_q の Tyr¹⁹² が YM-254890 感受性に影響を与えたことを示す実験的データは、この新しい G_q-YM-254890 結合モデルの妥当性を支持するものと考えられる。

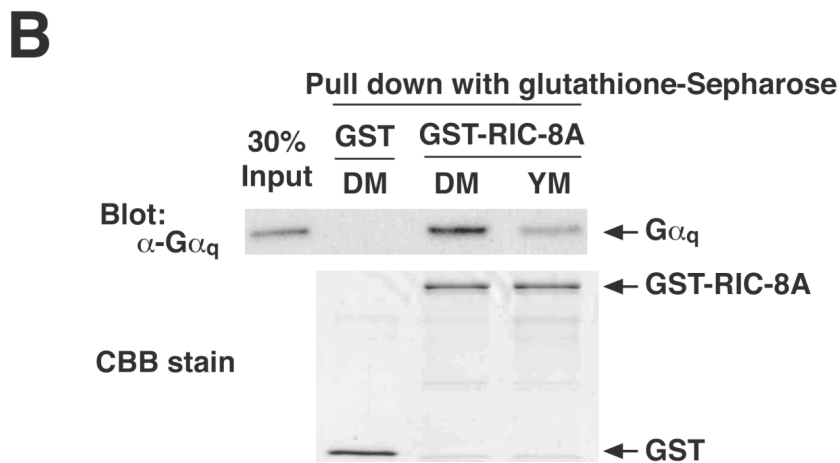
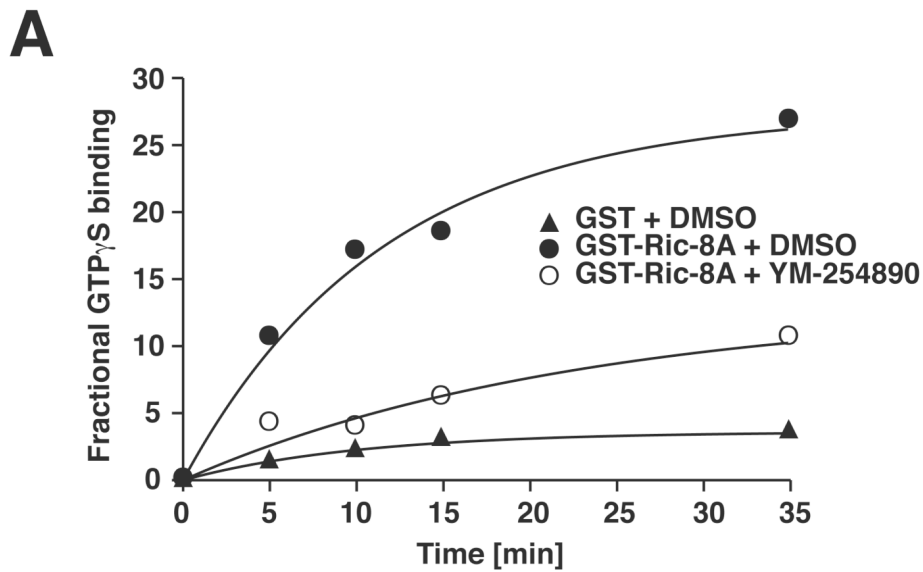


図 2-2 Ric-8A により誘導される G α_q のグアニンヌクレオチド交換反応に対する YM-254890 の効果

A) G α_q の GTP γ S 結合の経時変化。100 nM G α_q を DMSO (黒塗り)、10 μ M YM-254890 (白抜き) で 3 分間前処理した。GTP γ S 結合反応は 200 nM GST (三角)、GST-Ric-8A (丸) 存在化で行った。実験結果は独立した 2 回の実験の内の 1 例を示す。

B) G α_q と GST-Ric-8A の *In vitro* 結合実験。50 nM G α_q を DMSO (DM)、10 μ M YM-254890 (YM) で前処理した後、200 nM GST-Ric-8A とインキュベーションした。GST-Ric-8A と結合した G α_q は pull-down と抗 G α_q 抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。

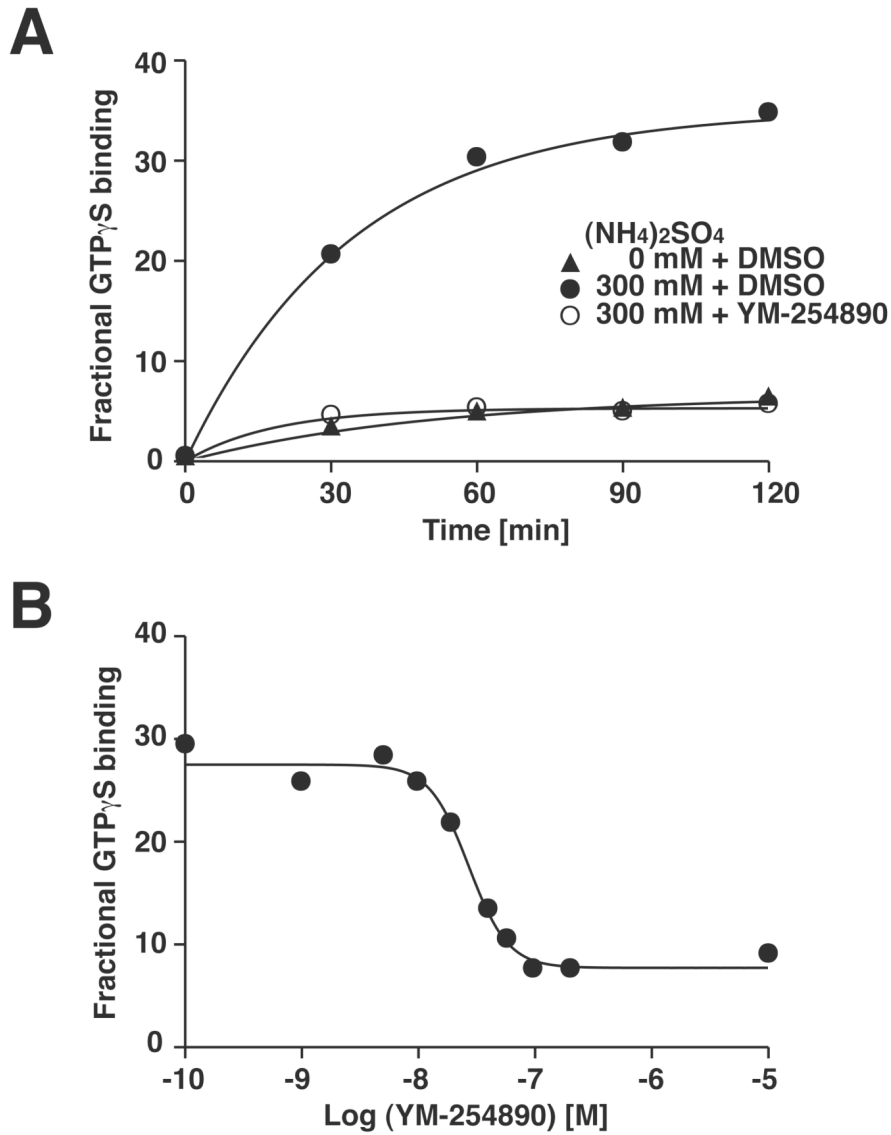


図 2-3 $G\alpha_q$ の自発的な $GTP\gamma S$ 結合に対する YM-254890 の効果

A) 経時変化。100 nM $G\alpha_q$ を DMSO (黒塗り)、10 μ M YM-254890 (白抜き) で 3 分間前処理した。GTP γ S 結合反応は 300 mM 硫酸存在下 (丸)、非存在下 (三角) で行った。

B) YM-254890 の用量依存的効果。100 nM $G\alpha_q$ を任意の濃度の YM-254890 で前処理した後、300 mM 硫酸存在下で 120 分間 GTP γ S 結合反応を行った。

実験結果は独立した 2 回の実験の内の 1 例を示す。

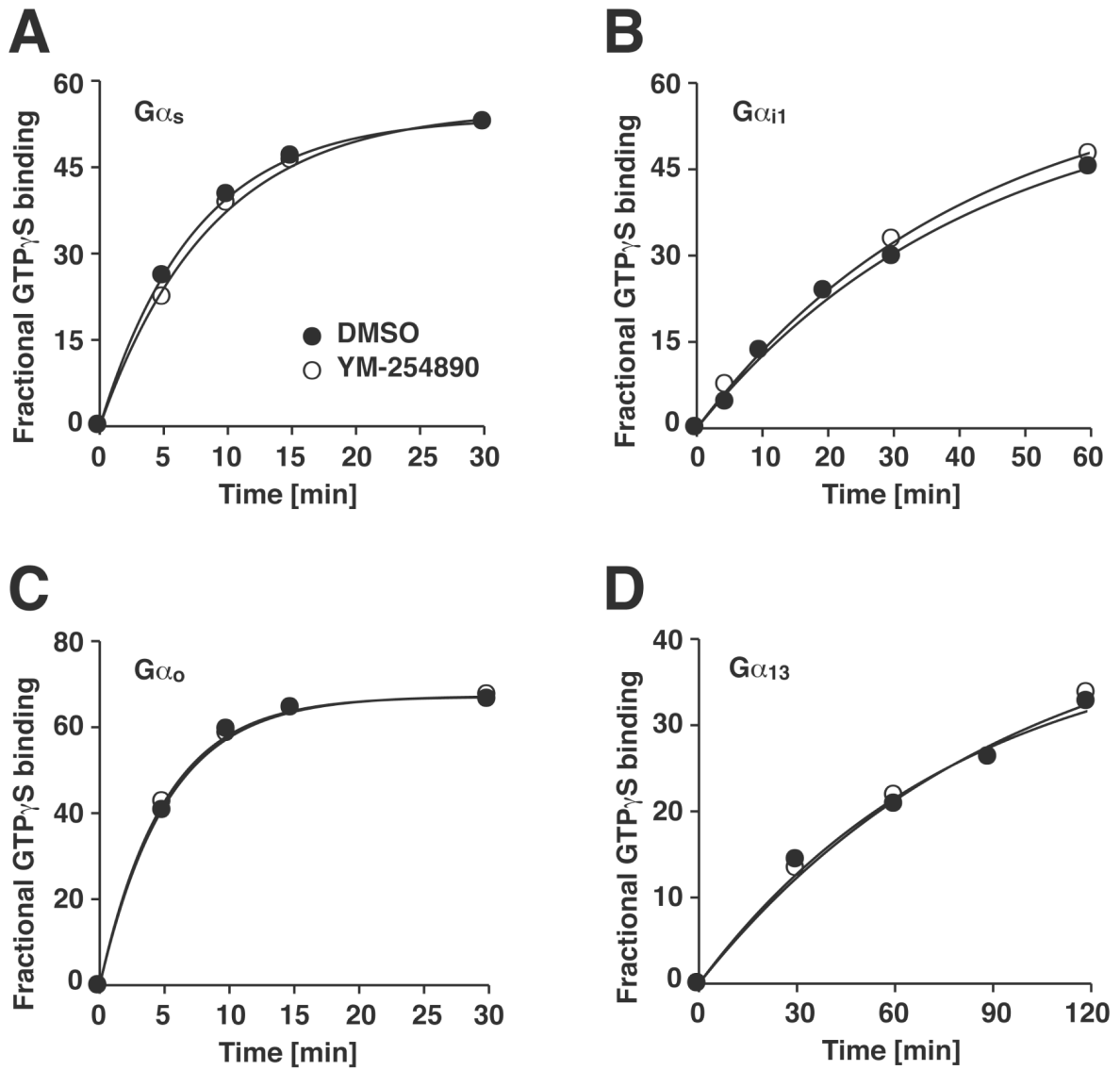


図 2-4 さまざまな $G\alpha$ サブユニットの $GTP\gamma S$ 結合に対する YM-254890 の効果

100 nM $G\alpha_s$ (A)、 $G\alpha_{i1}$ (B)、 $G\alpha_o$ (C)、 $G\alpha_{13}$ (D) を DMSO (黒塗り丸)、10 μ M YM-254890 (白抜き丸) で前処理した後、 $GTP\gamma S$ 結合反応を行った。実験結果は独立した 2 回の実験の内の 1 例を示す。

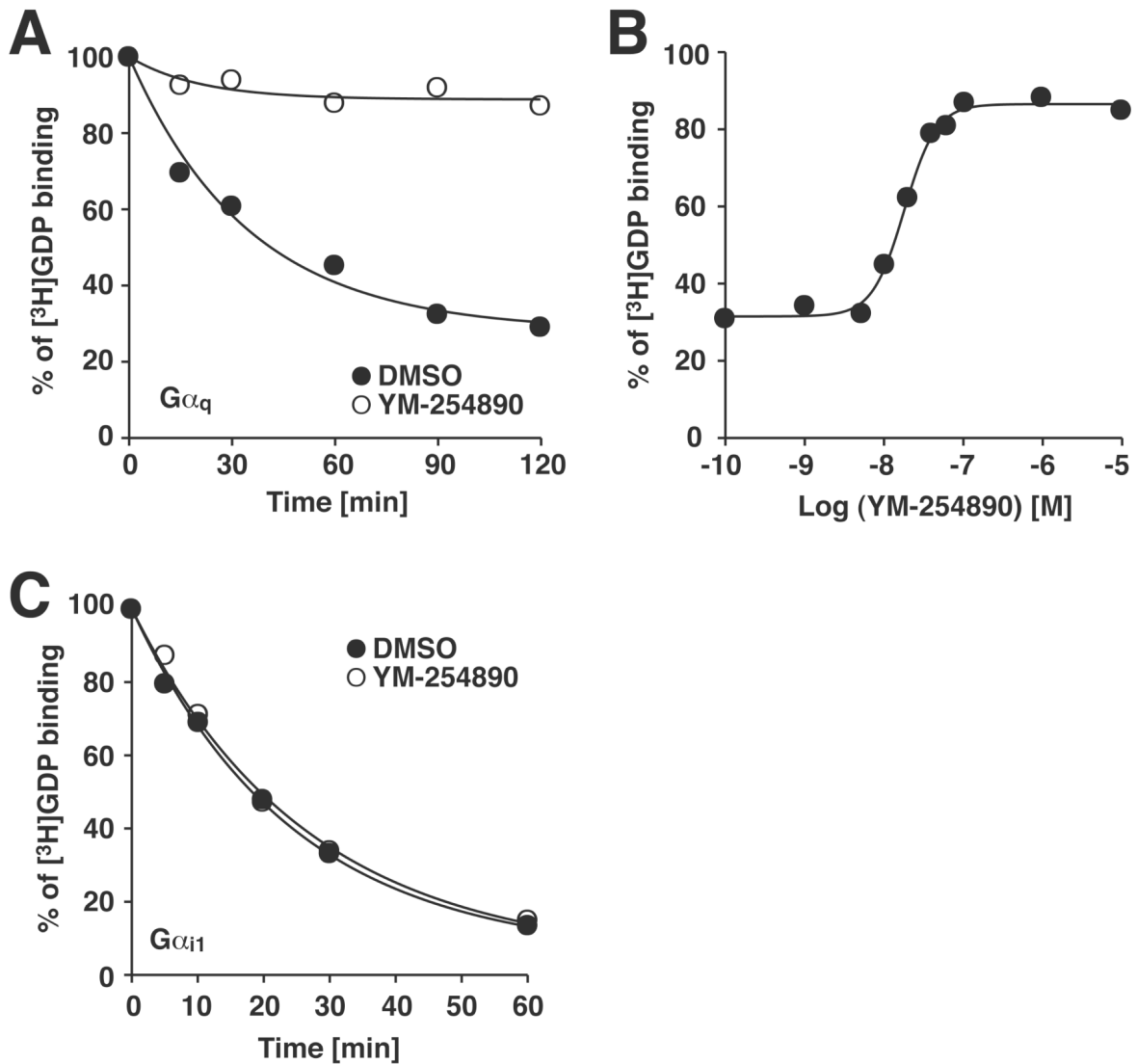


図 2-5 $G\alpha_q$ からの GDP 解離に対する YM-254890 の効果

A) $G\alpha_q$ からの GDP 解離の経時変化。100 nM $G\alpha_q$ を 2 μ M [3H]GDP とインキュベーションすることにより [3H]GDP を取り込ませた。50 nM $G\alpha_q$ からの GDP 解離反応は 500 μ M 非放射性 GDP、400 mM 硫安と DMSO (黒塗り丸) もしくは 10 μ M YM-254890 (白抜き丸) 存在下で行った。

B) YM-254890 の用量依存的効果。50 nM $G\alpha_q$ からの GDP 解離は任意の濃度の YM-254890 存在下で 120 分間反応させた。

C) $G\alpha_{i1}$ からの GDP 解離の経時変化。50 nM $G\alpha_{i1}$ からの GDP 解離反応は 500 μ M 非放射性 GDP と DMSO (黒塗り丸) もしくは 10 μ M YM-254890 (白抜き丸) 存在下で行った。

実験結果は独立した 2 回の実験の内の 1 例を示す。

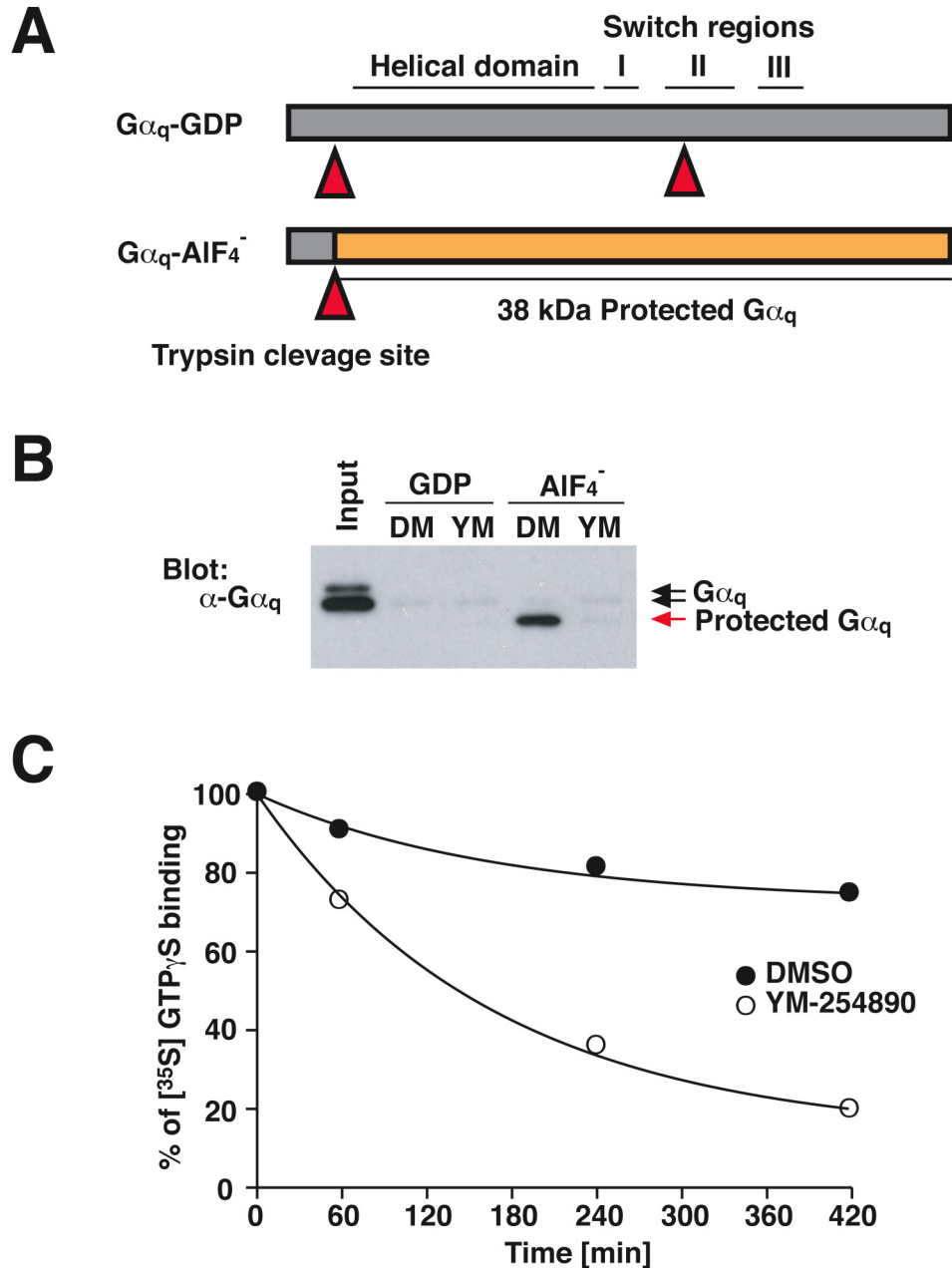


図 2-6 活性化型 $G\alpha_q$ に対する YM-254890 の効果

A) $G\alpha_q$ に対する Trypsin protection assay の概要。赤塗り矢頭は Trypsin により切断される部分を示す。GDP 型の $G\alpha_q$ は 2 ヶ所で Trypsin による切断を受ける。一方、 AIF_4^- 処理をした $G\alpha_q$ はスイッチ II 領域が Trypsin による切断を受けないので、38 kDa の部分分解産物（オレンジ）を生じる。

B) YM-254890 存在下での $G\alpha_q$ の Trypsin protection。 $G\alpha_q$ を GDP もしくは AIF_4^- で前処理した後、DMSO (DM)、10 μ M YM-254890 (YM) と反応させた。その後、Trypsin で $G\alpha_q$ を切断し、抗 $G\alpha_q$ 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。黒矢印は $G\alpha_q$ 全長、赤矢印は 38 kDa の部分分解産物を示す。

C) $G\alpha_q$ からの GTP γ S 解離に対する YM-254890 の効果。100 nM $G\alpha_q$ を 4 μ M [35 S]GTP γ S とインキュベーションすることにより [35 S]GTP γ S を結合させた。50 nM $G\alpha_q$ からの GTP γ S 解離反応は 1 mM 非放射性 GTP γ S、600 mM 硫酸と DMSO（黒塗り丸）もしくは 10 μ M YM-254890（白抜き丸）存在下で行った。実験結果は独立した 2 回の実験の内の 1 例を示す。

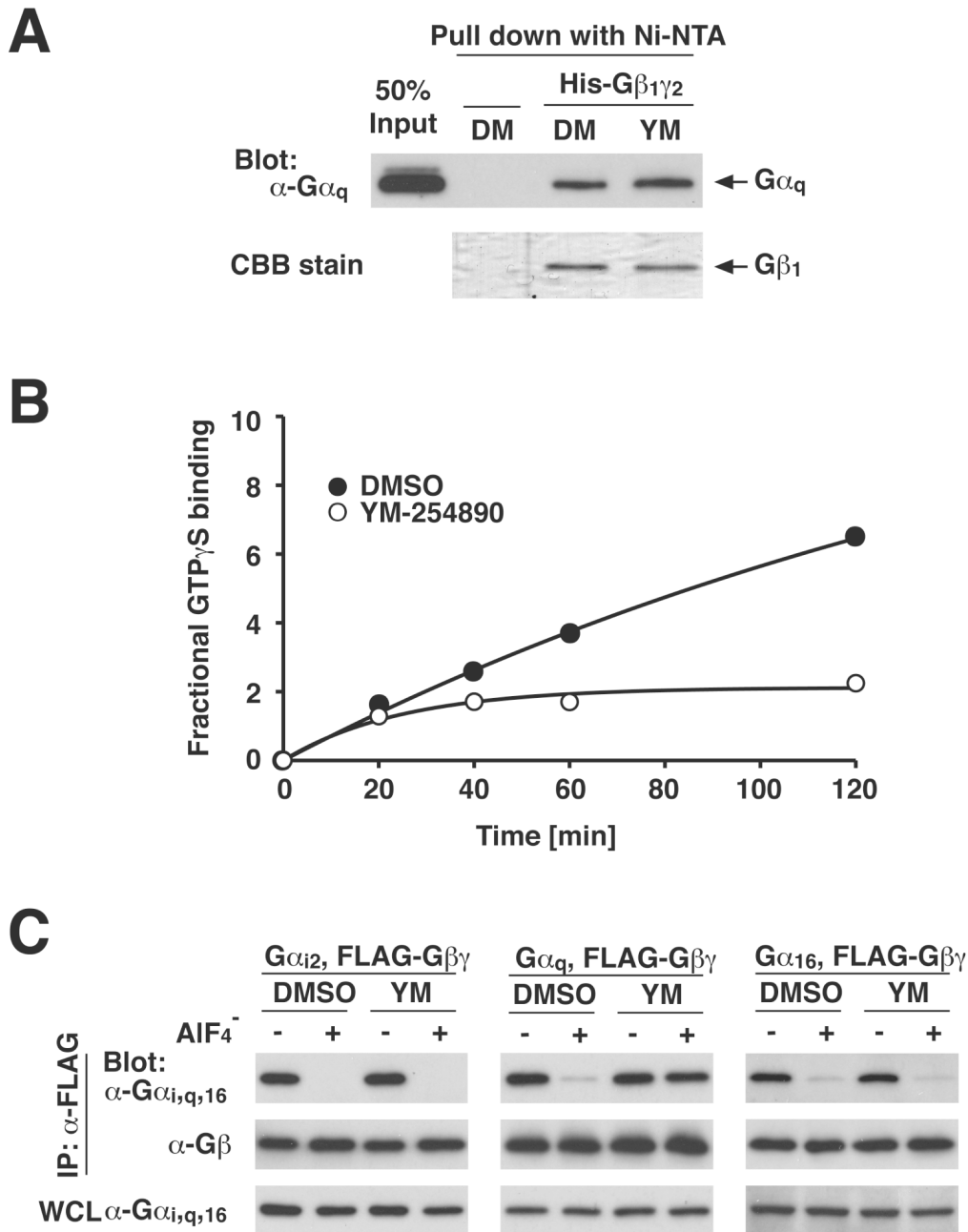


図 2-7 三量体 G $\alpha\beta\gamma$ の活性化に対する YM-254890 の効果

A) G α_q と His-G $\beta\gamma$ の *In vitro* 結合実験。50 nM G α_q を DMSO (DM) 、10 μ M YM-254890 (YM) で前処理した後、500 nM His-G $\beta_1\gamma_2$ とインキュベーションした。His-G $\beta_1\gamma_2$ と結合した G α_q は pull-down と抗 G α_q 抗体を用いたウエスタンブロットで解析した

B) G $\alpha\beta\gamma$ の GTP γ S 結合の経時変化。His-G $\alpha_{i,q}$ 、G β_1 と His-G γ_2 CS の三量体からなる 200 nM His-G $\alpha_{i,q}\beta\gamma$ CS を DMSO (黒塗り)、10 μ M YM-254890 (白抜き) で 3 分間前処理した。GTP γ S 結合反応は 300 mM 硫酸存在下で行った。実験結果は独立した 2 回の実験の内の 1 例を示す。

C) AIF $_4$ により誘導される G α と G $\beta\gamma$ の解離。G α (G α_{i2} 、G α_q もしくは G α_{16})、G β_1 と FLAG-G γ_2 をトランスフェクションした 293T 細胞を DMSO もしくは 10 μ M YM-254890 (YM) で 30 分間前処理した。AIF $_4$ でさらに 2 時間処理を行った後、細胞抽出液を調製した。抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行うことにより、FLAG-G $\beta\gamma$ と共沈した G α を解析した。

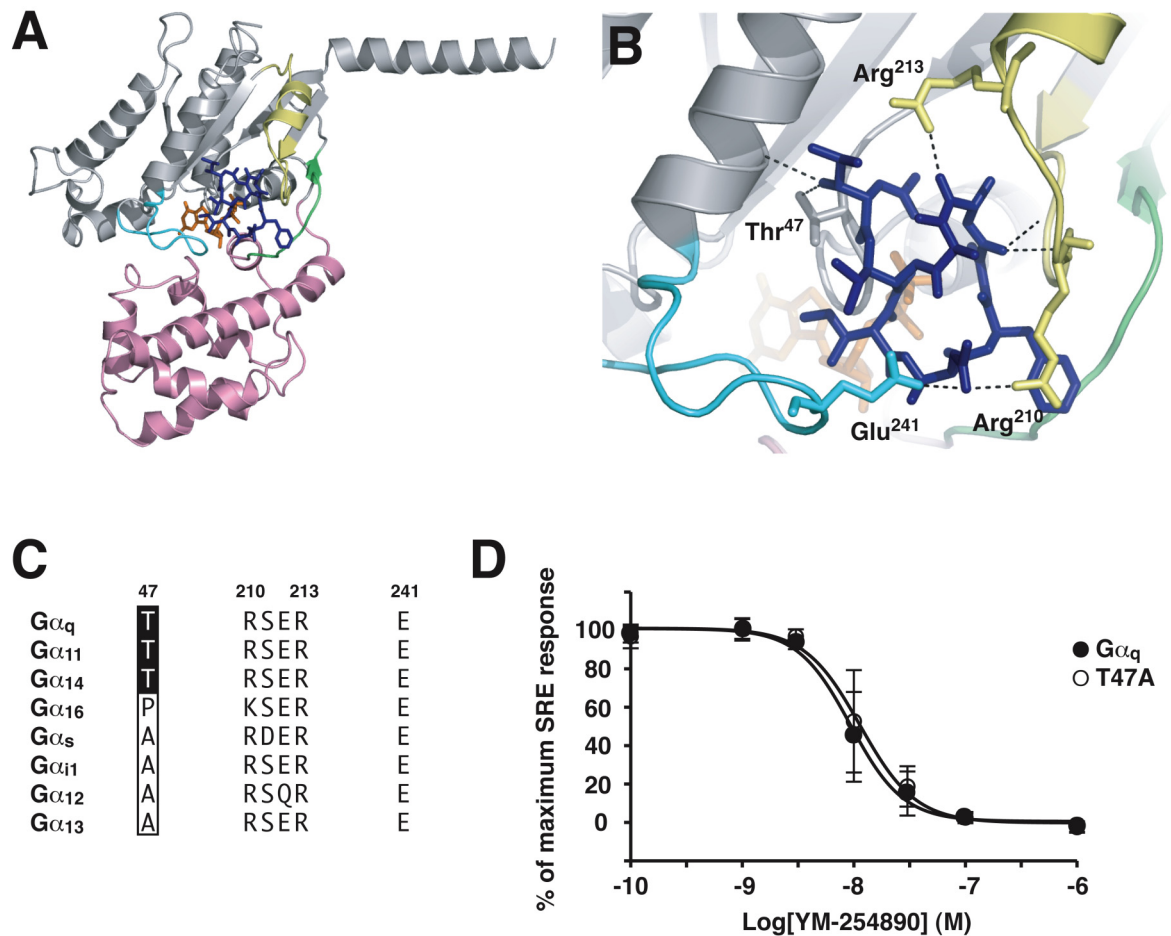


図 2-8 ドッキングシュミレーションから予想された G α_q -YM-254890 結合モデル (モデル 1)

A) モデル 1 の全体図。G α_q は Ras-like GTPase ドメイン (灰色) と Helical ドメイン (ピンク色) からなり、2 つのドメインの間に GDP (オレンジ色) が存在する。Ras-like GTPase ドメインには 3 つのスイッチ領域 (I: 緑色、II: 黄色、III: 水色) が存在し、予想モデルにおいて YM-254890 (青色) は 3 つのスイッチ領域で囲まれた部分に結合している。

B) G α_q -YM-254890 結合領域の拡大図。黒色破線は G α_q と YM-254890 間で形成されると予想された水素結合を示す。

C) G α_q Thr⁴⁷、Arg²¹⁰、Arg²¹³、Glu²⁴¹ 部分における各 G α 間でのマルチプルアライメント。色抜き文字は YM-254890 感受性である G α_q 、G α_{11} と G α_{14} でのみ保存されたアミノ酸を示す。

D) G α_q T47A による SRE 転写活性化に対する YM-254890 の用量依存的効果。293T 細胞に G α_q もしくは G α_q T47A (WT もしくは RC)、pSRE-Luc と pEF-RLuc をトランスフェクションした。その後、各種濃度の YM-254890 を添加して 18 時間培養した。グラフ縦軸は各 G α WT の SRE 活性を 0%、各 G α RC の最大 SRE 活性を 100% として表した。それぞれの値は 3 回の独立した実験からの平均値と標準偏差を示す。

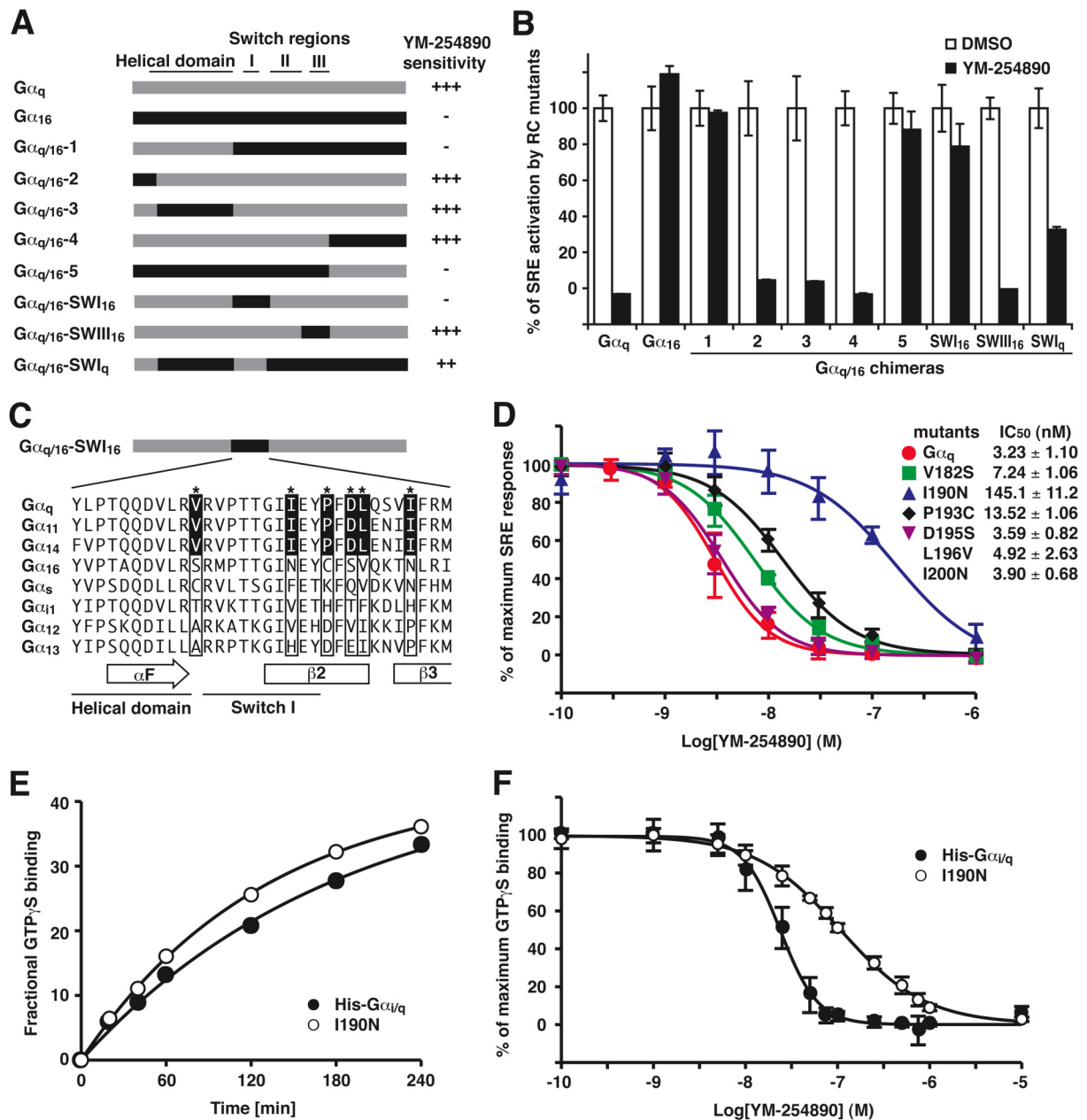


図 2-9 $G\alpha_{q/16}$ キメラと $G\alpha_q$ 点変異体の YM-254890 感受性

A) $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{16}$ と $G\alpha_{q/16}$ キメラの概略図。灰色は $G\alpha_q$ 由来の領域、黒は $G\alpha_{16}$ 由来の領域を示す。

B) 各 $G\alpha$ の RC 変異体による SRE 転写活性化に対する YM-254890 の阻害効果。293T 細胞に各 $G\alpha$ WT もしくは RC の発現ベクター、pSRE-Luc と pEF-RLuc をトランスフェクションした。その後、DMSO (白色棒)、5 μ M YM-254890 (黒色棒) を添加し、18 時間培養した。棒グラフ縦軸は各 $G\alpha$ WT の SRE 活性を 0%、DMSO 添加時の各 $G\alpha$ RC の SRE 活性を 100% として表した。

C) $G\alpha_{q/16}$ -SWI₁₆ の $G\alpha_{16}$ 由来領域における各 $G\alpha$ 間でのマルチプルアライメント。アスタリスクは YM-254890 感受性である $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{11}$ と $G\alpha_{14}$ でのみ保存されたアミノ酸を示す。

D) 各 $G\alpha_q$ 点変異体による SRE 転写活性化に対する YM-254890 の用量依存的阻害効果。

E) His- $G\alpha_{i/q}$ I190N 組換え蛋白質の GTP γ S 結合の経時変化。100 nM His- $G\alpha_{i/q}$ と His- $G\alpha_{i/q}$ I190N の GTP γ S 結合反応は 300 mM 硫酸存在下で行った。(F の脚注は次のページに記載)

F) His-G $\alpha_{i/q}$ I190N の GTP γ S 結合に対する YM-254890 の用量依存的効果。100 nM His-G $\alpha_{i/q}$ 、もしくは His-G $\alpha_{i/q}$ I190N を示した濃度の YM-254890 で前処理した後、300 mM 硫安存在下で 150 分間 GTP γ S 結合反応を行った。グラフ縦軸は各 G α の最大 GTP γ S 結合量を 100%として表した。

B, D, F のそれぞれの値は 3 回の独立した実験からの平均値と標準偏差を示す。E の実験結果は独立した 2 回の実験の内の 1 例を示す。

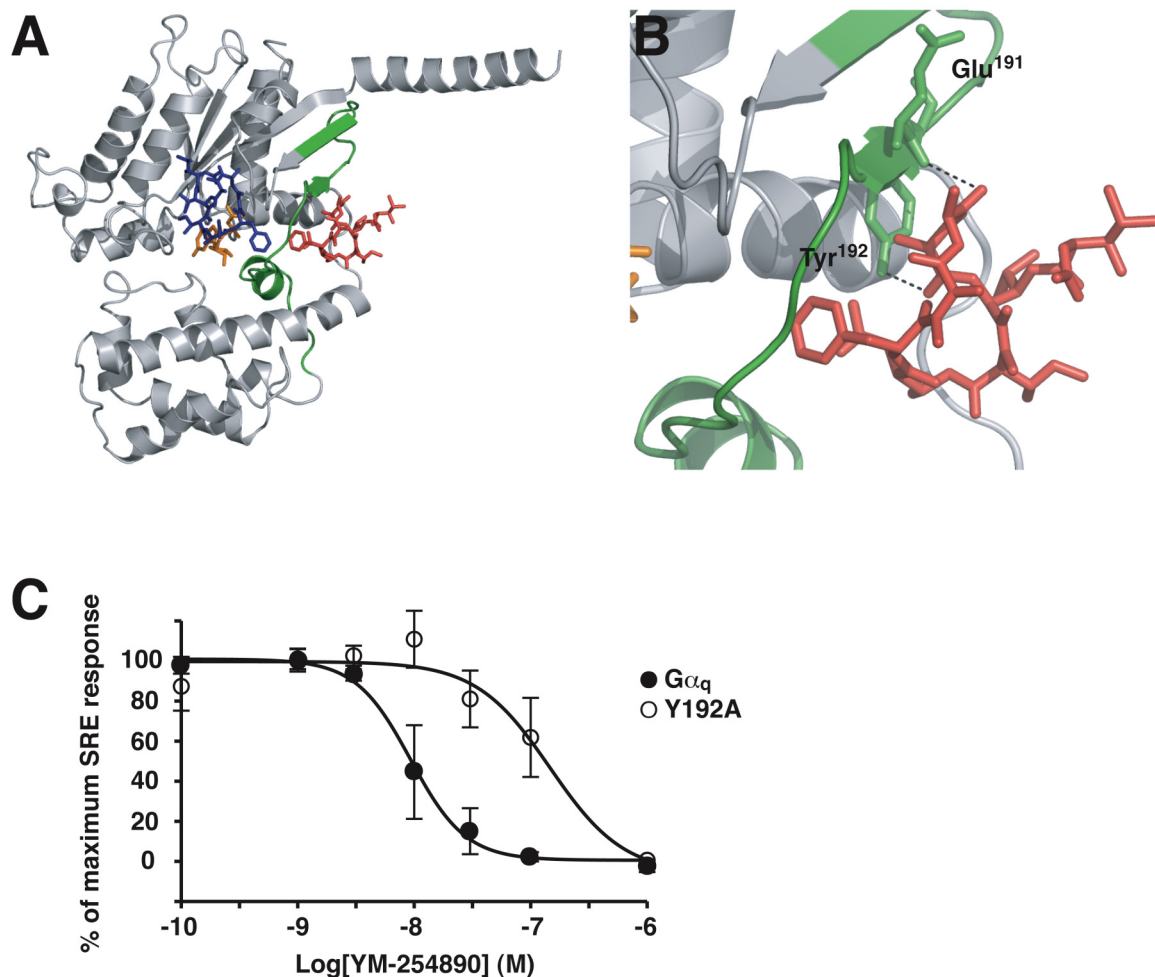


図 2-10 再構築したドッキングシュミレーションによる $G\alpha_q$ -YM-254890 結合モデル (モデル 2)

A) モデル 2 の全体図。 $G\alpha_q$ (灰色) のうち緑色で示した領域は、 $G\alpha_{q16}$ -SWI₁₆ で $G\alpha_{16}$ の配列に組み換えていた部分を示す。モデル 1 における YM-254890 は青色、モデル 2 における YM-254890 は赤色で示す。

B) $G\alpha_q$ -YM-254890 結合領域の拡大図。黒色破線は $G\alpha_q$ と YM-254890 (赤色) 間で形成されると予想された水素結合を示す。

C) $G\alpha_q$ Y192A による SRE 転写活性化に対する YM-254890 の用量依存的効果。それぞれの値は 3 回の独立した実験からの平均値と標準偏差を示す。

2-4 考察

本章における研究の目的は、生化学的解析を基に $G\alpha_q$ に対する YM-254890 の作用機構を解析することであった。まず私は YM-254890 が GEF (Ric-8A) により誘導される $G\alpha_q$ の活性化を阻害するだけでなく (図 2-2)、 $G\alpha_q$ の自発的な GDP/GTP 交換反応を直接かつ非常に高い $G\alpha$ 特異性をもって阻害することを明らかにした (図 2-3、2-4)。次に、GDP の解離と GTP の取り込みに分けられる GDP/GTP 交換反応の内、YM-254890 は前者の GDP 解離を阻害することを明らかにした (図 2-5)。これらの結果は、YM-254890 が $G\alpha_q$ 特異的な GDP 解離阻害因子として機能することを示している。G 蛋白質の阻害剤としては百日咳毒素が知られているが、YM-254890 の作用機構は、 $G\alpha_i$ と受容体の相互作用を阻害する百日咳毒素の作用機構とは全く異なっていた。

YM-254890 は $G\alpha_q$ の GDP 解離を阻害する初めての化合物であるが、 $G\alpha_i$ の GDP 解離を阻害する蛋白質として GoLoco ドメインをもった蛋白質が知られている (De Vries *et al.*, 2000; Natochin *et al.*, 2000)。GDI 活性を持つ GoLoco ドメインは、受容体非依存的に G 蛋白質シグナルを促進する AGS3 から見つかった (Takesono *et al.*, 1999)。 $G\alpha_i$ に対する GoLoco ドメインの作用機構はこれまでに生化学的解析や X 線結晶構造解析から詳細な解析が進められている。今回 YM-254890 の解析を通じて、YM-254890 と GoLoco の作用機構ではいくつかの点で大きく異なっていることが明らかとなった。第一の点は、 $G\beta\gamma$ に対する作用の違いである。 $G\alpha$ との相互作用に関して GoLoco ドメインと $G\beta\gamma$ は拮抗し、三量体 $G\alpha\beta\gamma$ に対して GoLoco ドメインは $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ の解離を促進する (Bernard *et al.*, 2001; Natochin *et al.*, 2001)。また、X 線結晶構造解析からも GoLoco ドメインと $G\beta\gamma$ の $G\alpha$ 結合部位は一部重複していることが報告されている (Kimple *et al.*, 2002)。一方、YM-254890 は $G\alpha_q$ と $G\beta\gamma$ の相互作用を阻害しなかった (図 2-7 A)。さらに、YM-254890 は三量体 $G\alpha_q\beta\gamma$ の活性化に対しても阻害効果を示した (図 2-7 B, C)。これらの結果は、YM-254890 は単量体 $G\alpha_q$ のみならず三量体 $G\alpha_q\beta\gamma$ に対しても GDP 解離阻害因子として機能することを示している。

YM-254890 と GoLoco ドメインの違いの第二点として活性型 $G\alpha$ に対する効果の違いが挙げられる。本研究から、YM-254890 は活性型 $G\alpha_q$ に対しても作用することが示唆された。 AlF_4^- によって遷移状態への構造変化を誘導した $G\alpha_q$ に対して YM-254890 を作用させると、 $G\alpha_q$ の構造が不活性型に戻ることを Trypsin protection assay から明らかにした (図 2-6 B)。また驚くべきことに、YM-254890 は $G\alpha_q$ からの GDP 解離を阻害するにもかかわらず、 $GTP\gamma S$ の解離は逆に促進した (図 2-6 C)。以上の結果から YM-254890 は活性型 $G\alpha_q$ に対して不活性型への構造変化を積極的に誘導していると考えられた。一方、GoLoco ドメインは $G\alpha_i-AlF_4^-$ や $G\alpha_i-GTP\gamma S$ とは全く結合せず、不活性型の $G\alpha_i-GDP$ にのみ作用すると考えられている (De Vries *et al.*, 2000)。しかしこ

のことに関しては、 $G\alpha_q$ のヌクレオチド結合状態の違いにより $G\alpha_q$ と YM-254890 の結合親和性に違いが生じるかを今後詳細に検討していく必要があると思われる。YM-254890 は分子量 960 Da の低分子化合物で修飾を行える反応基もないことから、Biacore で直接の相互作用を解析することは困難であった。今後は等温滴定カロリメトリー法を用いた詳細な相互作用解析などを行っていきたいと考えている。

YM-254890 の $G\alpha$ 特異性を決定する分子機構を調べるために、 $G\alpha_{q16}$ キメラ蛋白質と $G\alpha_q$ 点変異体の YM-254890 感受性を解析した。その結果、 $G\alpha_q$ のスイッチ I 領域、特に Ile¹⁹⁰ と Tyr¹⁹² が YM-254890 の認識に関与することを明らかにした (図 2-9、2-10)。スイッチ I 領域は結合した GDP の安定性と GTP 加水分解反応に重要な領域であることが知られている (Sprang, 1997)。GDI として機能する $G\beta\gamma$ と GoLoco ドメインは、 $G\alpha_i$ - $G\beta\gamma$ 複合体と $G\alpha_i$ -GoLoco 複合体の立体構造解析から、 $G\alpha_i$ のスイッチ I 領域の構造変化を誘導することがわかっている。この構造変化に従って、スイッチ I の Arg¹⁷⁸ と G1 モチーフの Glu⁴³ の間で Salt bridge が形成される。R178/E43 の Salt bridge はヌクレオチド結合ポケットに入っている GDP にフタをするように形成され、GDP の解離が阻害されると予想される (図 2-11 A)。R178/E43 の Salt bridge 形成を誘導することが $G\beta\gamma$ および GoLoco ドメインによる GDP 解離阻害の主要な作用と考えられている (Wall *et al.*, 1995; Lambright *et al.*, 1996; Kimple *et al.*, 2002)。恒常活性型変異体として働く $G\alpha_q$ R183C 変異体は、スイッチ I 領域の Arg¹⁸³ が Cys に変化しているため、Arg¹⁸³ と Glu⁴⁹ との間で Salt bridge を形成することが出来ない ($G\alpha_q$ の Arg¹⁸³ と Glu⁴⁹ は $G\alpha_{i1}$ の Arg¹⁷⁸ と Glu⁴³ に対応する)。驚くべきことに、YM-254890 は $G\alpha_q$ R183C 変異体の活性化に対しても阻害効果を示す。YM-254890 の GDP 解離阻害機構は R183/E43 の Salt bridge 形成とは無関係であり、これまでの GDI とは作用機構が異なることが示唆された。

今回、折田正弥博士の協力のもと行われたドッキングシュミレーションから 2 種類の $G\alpha_q$ -YM-254890 結合モデル (モデル 1: 図 2-8 A、モデル 2: 図 2-10 A) が構築された。両者の結合モデルを基に行った点変異体解析からはモデル 2 を支持する実験結果が得られた。

モデル 1 において、YM-254890 は $G\alpha_q$ の 3 つのスイッチ領域に囲まれて出来た大きな窪みにはまり込む形で結合していた。この窪み部分はヌクレオチドが出入りする為の通路になっていると考えられており、GDI による $G\alpha_i$ の R178/E43 の Salt bridge もこの部分で形成されている。YM-254890 はヌクレオチドの出口にフタをするようにはまり込むことで、GDP の解離を阻害するという、 $G\beta\gamma$ と GoLoco ドメインに似た作用機構が予想される。モデル 1 は GDP 解離阻害という観点だけを考えれば非常に適切なモデルと考えられる。しかしながら、YM-254890 は GDI とは違い活性型 $G\alpha_q$ に対しても作用する。YM-254890 が GTP γ S の解離を促進する実験結果が得られている (図

2-6)。モデル 1 のようにヌクレオチドの出口にフタをするように YM-254890 が結合すると GTP γ S の解離は逆に阻害されてしまうと予想される。また、モデル 1 では YM-254890 はスイッチ II とスイッチ III 領域内のアミノ酸と多くの水素結合をつくっている。一方、キメラ解析から YM-254890 の認識に関わることが予想されたスイッチ I と YM-254890 は少し離れている。さらにスイッチ II とスイッチ III 領域は不活性型 G α と活性型 G α とで構造が大きく変化することが知られている (図 2-11 B)。G α の活性状態によってこの領域のアミノ酸側鎖の配置、窪みの形は共に大きく変化するため、モデル 1 において、不活性型 G α_q と活性型 G α_q が同じように YM-254890 を認識するとは考えにくい。

モデル 2 において、YM-254890 は G α_q 分子の外側からスイッチ I 領域によって形成される窪みに結合している。このモデルでの YM-254890 の作用としては、モデル 1 で見られるような YM-254890 自身が直接ヌクレオチドの出入り口を塞ぐものではなく、G α_q の構造に影響を与えることにより起こるものと思われる。G α のスイッチ II 領域は不活性型 G α では Trypsin による切断を受けやすく、活性型 G α では Trypsin による切断を受けにくい構造をしている。図 2-6 B から、YM-254890 で処理した G α_q ではスイッチ II 領域が Trypsin による切断を受けた。このことから YM-254890 結合時の G α_q の構造に関して、少なくともスイッチ II 領域は不活性型 G α の構造をとっていることがわかる。スイッチ I とスイッチ III についてもスイッチ II と連動して不活性 G α の構造をとっていることが予想される。これらのことから YM-254890 の作用原理としては、まず YM-254890 が結合することにより G α_q の構造を不活性型もしくはそれに近い状態に安定化する。それによって G α_q の GDP に対するアフィニティーが高まり、逆に GTP に対するアフィニティーが低下するのではないかと予想している。また、スイッチ I 領域は G α の活性状態による構造変化が比較的少ない。この部分は G α の活性状態によってアミノ酸側鎖の配置、窪みの形に大きな変化は見られず、不活性型 G α_q と活性型 G α_q は同じように YM-254890 を認識できるのではないかと予想される。さらにモデル 2 において、YM-254890 のベンゼン環部分が G α_q 表面のリング状のポケット部分にはまり込んでいた (図 2-12)。Ile¹⁹⁰ の側鎖は丁度このベンゼン環部分に向かって伸びていて、ポケットの一部分を担っている。Ile¹⁹⁰ はポケット部分の疎水性環境を形成しており、Asn に置換することでベンゼン環部分との疎水力が弱まり、YM-254890 感受性が低下したのではないかと考えられる。

今回提唱した G α_q -YM-254890 結合モデルはコンピュータシミュレーションに基づいたものであり、さらに用いた G α_q 、YM-254890 の構造は類似構造物からモデリングしたものである。このことから、実際の G α_q -YM-254890 結合モデルとは異なっている可能性も考えられる。また、YM-254890 が結合することによって G α_q の構造にどのような変化が生じるか、その詳細はわかっていない。今後さらに、YM-254890 の作用

機構を詳細に解明していく為には、 $G\alpha_q$ -YM-254890 複合体の立体構造を明らかにすることが不可欠である。そこで現在私は、X 線結晶構造解析から $G\alpha_q$ -YM-254890 複合体構造を明らかにするための研究を進めている。また、YM-254890 の作用機構の解明を通じて、YM-254890 をリード化合物とした他の G 蛋白質に対する阻害剤開発などに研究が発展していくものと期待される。

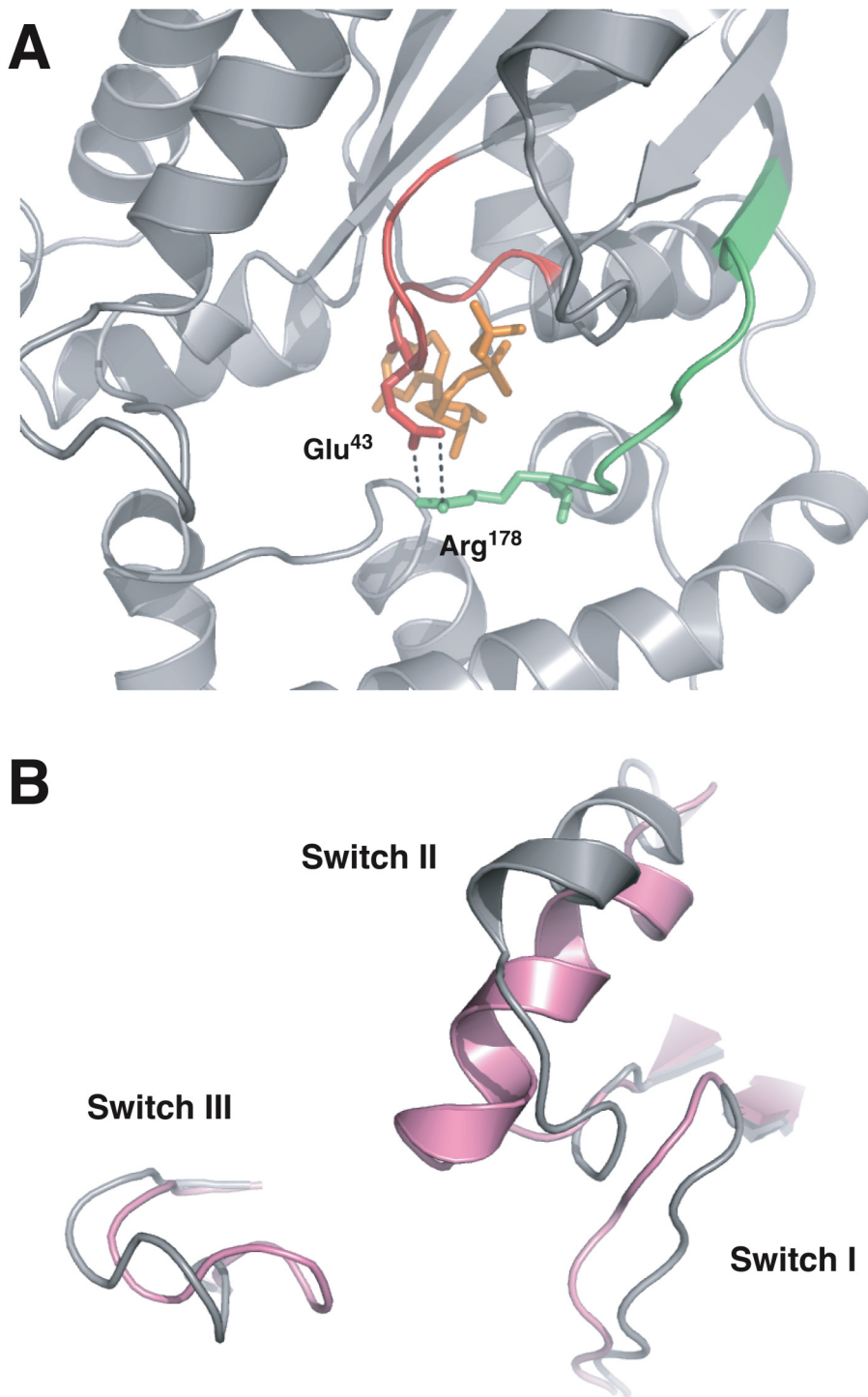


図 2-11 $G\alpha$ の構造変化

A) $G\beta\gamma$ により誘導される $G\alpha_i$ の R178/E43 Salt bridge 形成。三量体 $G\alpha_i\beta\gamma$ の立体構造 (PDB 番号: 1GP2) の内、G1 モチーフ領域を赤色、スイッチ I 領域を緑色で示す。 Glu^{43} と Arg^{178} の間で形成される Salt bridge を黒色破線で示す。

B) $G\alpha_i$ の活性状態によるスイッチ領域の構造変化。GDP 結合型 $G\alpha_i$ (PDB 番号: 1GP2) を灰色、GTP γ S 結合型 $G\alpha_i$ (PDB 番号: 1BH2) をピンク色で示す。 $G\alpha_i$ の 3 つのスイッチ領域部分を表示する。

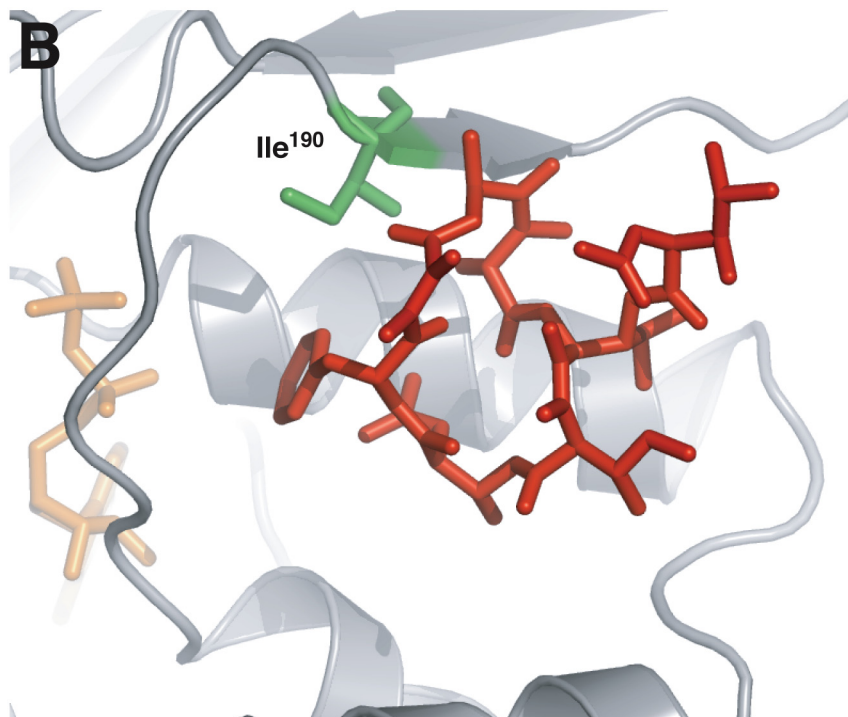
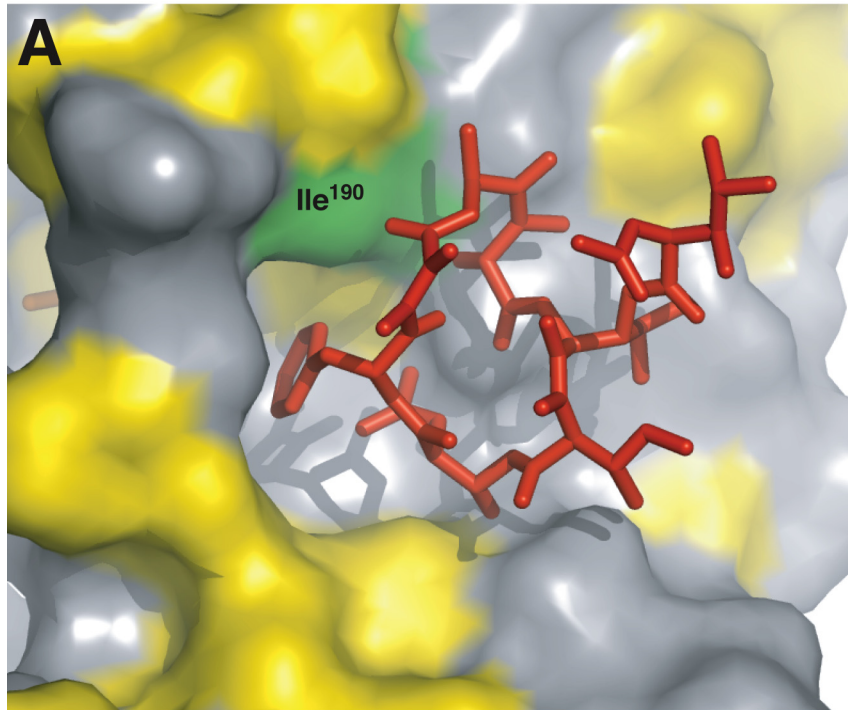


図 2-12 $G\alpha_q$ -YM-254890 結合モデル 2 における Ile¹⁹⁰ と YM-254890 の関係

A) 分子表面モデル。Gα_q の疎水性アミノ酸の分子表面を黄色、Ile¹⁹⁰ の分子表面を緑色、その他の分子表面を灰色で示す。YM-254890 は赤色のスティックモデルで示す。

B) リボンモデル。Gα_q の Ile¹⁹⁰ を緑色で、その他を灰色で示す。GDP をオレンジ色で、YM-254890 を赤色で示す。

総括

今回、私は $G\alpha_q$ の新たな制御因子 Ric-8A と YM-254890 に関して機能解析を進めてきた。まず第一章においては、非受容体型 GEF としての活性を持った Ric-8A が G_q シグナル経路に果たす役割について解析を行った。そして、Ric-8A は細胞膜上で働く新たな G 蛋白質制御分子として G_q 共役型受容体を介したシグナルをポジティブに制御していることを明らかにした。第二章においては、 G_q シグナルを阻害する作用を持つ YM-254890 について、その詳細な阻害メカニズムの解明を行った。その結果として YM-254890 は $G\alpha_q$ の GDP 解離を阻害していること、さらに $G\alpha_q$ のスイッチ I 領域が YM-254890 の認識に関与していることを明らかにした。これらの結果を基にドッキングシュミレーションによる $G\alpha_q$ -YM-254890 結合モデルの構築を行い、そこから予想される YM-254890 の作用機構について考察した。

Ric-8A と YM-254890 は共にまったくユニークで特徴的な性質を有した制御因子である。Ric-8A は GPCR 同様 GEF 活性を持つが、GPCR が三量体 $G\alpha\beta\gamma$ に作用するのに対して、Ric-8A は単量体 $G\alpha$ にしか働かない点で大きな違いがある。YM-254890 もこれまで知られている GDI と同様に $G\alpha$ の GDP 解離を阻害するが、活性型 $G\alpha$ に対する振る舞いは大きく異なる。また、 $G\alpha_q$ に対する Ric-8A と YM-254890 の作用機構を比較すると、両者はまったく正反対の性質を持った制御分子であることがわかる。すなわち、GEF として機能する Ric-8A は $G\alpha_q$ の GDP 解離を促進するのに対し、YM-254890 は GDP 解離を抑制する。 $G\alpha$ からの GDP 解離は G 蛋白質活性化における重要な初期反応であるが、現在までのところ、GPCR が $G\alpha$ からの GDP 解離を誘導する作用機構はほとんど明らかにされていない。 $G\alpha$ の GDP 解離に対して相反する 2 つの性質をもった Ric-8A と YM-254890 の作用機構を解明していくことは、それぞれの独特な G 蛋白質制御機構を明らかにするだけでなく、GPCR が G 蛋白質活性化を誘導する作用機構を解明するための手助けにもなると考えられる。そして、これらの研究結果は G 蛋白質の活性化を標的とした創薬研究に大きく貢献できると期待される。

謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞内情報学講座の伊東広教授のもとで行われました。

本研究を遂行するにあたり、長年にわたる多大なるご指導とご助言を頂いた伊東広教授に心より感謝いたします。また、常に適切なアドバイスとご指導を頂いた稲垣直之助教授、水野憲一助手、多胡憲治助手、島田忠之助手に厚くお礼申し上げます。YM-254890 を提供していただきましたアステラス製薬株式会社の高崎淳博士と谷口昌要博士、さらに YM-254890 と $G\alpha_q$ のドッキングシュミレーション実験のデータを提供していただきましたアステラス製薬株式会社の折田正弥博士に深く感謝申し上げます。東京薬科大学の多賀谷光男博士には抗 Ric-8A 抗体を、イリノイ大学シカゴ校の小笹徹博士には G_q , G_{13} , $G\beta_1$, His- $G\gamma_2$ 発現バキュロウイルスを、愛知県心身障害者コロニーの浅野富子博士には抗 $G\alpha_i$ 抗体を提供していただきました。この場を借りて感謝申し上げます。研究室に配属された当初、素人同然の私に実験の基礎と取り組む姿勢を教えてくださいました国立成育医療センターの山内淳司博士と宮本幸博士に深く感謝申し上げます。菅原庸先輩には5年間の間常に的確なアドバイスと有意義なディスカッションをしていただきました。さらに浦野大輔君、鳥山道則君、中田飛鳥さん、森達也くんとは同期として5年間実験の苦楽を分かち合ってきました。本講座の皆様のおかげで、この5年間に及ぶ研究生活はかけがえのないものになりました。この場を借りて深く感謝申し上げます。

最後になりましたが、21年という長い年月の間学生生活を送ることが出来たのは家族の暖かい支えがあったからです。私の大学院進学の希望を受け入れ、様々な形でご援助くださった両親と姉に心より感謝申し上げます。

西村 明幸

参考文献

- Akhter, S. A., Luttrell, L. M., Rockman, H. A., Iaccarino, G., Lefkowitz, R. J., and Koch, W. J. (1998). Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science* **280**, 574-577.
- Amstrup, J., and Novak, I. (2003). P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx. *Biochem. J.* **374**, 51-61.
- Bae, Y. S., Lee, T. G., Park, J. C., Hur, J. H., Kim, Y., Heo, K., Kwak, J. Y., Suh, P. G., and Ryu, S. H. (2003). Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1043-1050.
- Berman, D. M., and Gilman, A. G. (1998). Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate. *J. Biol. Chem.* **273**, 1269-1272.
- Bernard, M. L., Peterson, Y. K., Chung, P., Jourdan, J., and Lanier, S. M. (2001). Selective interaction of AGS3 with G-proteins and the influence of AGS3 on the activation state of G-proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 1585-1593.
- Bernstein, L. S., Grillo, A. A., Loranger, S. S., and Linder, M. E. (2000). RGS4 binds to membranes through an amphipathic alpha -helix. *J. Biol. Chem.* **275**, 18520-18526.
- Blumer, J. B., Cismowski, M. J., Sato, M., and Lanier, S. M. (2005). AGS proteins: receptor-independent activators of G-protein signaling. *Trends. Pharmacol. Sci.* **26**, 470-476.
- Cassel, D., and Pfeuffer, T. (1978). Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 2669-2673.
- Chidiac, P., Markin, V. S., and Ross, E. M. (1999). Kinetic control of guanine nucleotide binding to soluble Galpha(q). *Biochem. Pharmacol.* **58**, 39-48.
- Czajkowski, R., Banachewicz, W., Ilnytska, O., Drobot, L. B., and Baranska, J. (2004). Differential effects of P2Y1 and P2Y12 nucleotide receptors on ERK1/ERK2 and

phosphatidylinositol 3-kinase signalling and cell proliferation in serum-deprived and nonstarved glioma C6 cells. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 497-507.

De Vries, L., Fischer, T., Tronchere, H., Brothers, G. M., Strockbine, B., Siderovski, D. P., and Farquhar, M. G. (2000). Activator of G protein signaling 3 is a guanine dissociation inhibitor for G α subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14364-14369.

Drenan, R. M., Doupnik, C. A., Boyle, M. P., Muglia, L. J., Huettner, J. E., Linder, M. E., and Blumer, K. J. (2005). Palmitoylation regulates plasma membrane-nuclear shuttling of R7BP, a novel membrane anchor for the RGS7 family. *J. Cell. Biol.* **169**, 623-633.

Druey, K. M., Sullivan, B. M., Brown, D., Fischer, E. R., Watson, N., Blumer, K. J., Gerfen, C. R., Scheschonka, A., and Kehrl, J. H. (1998). Expression of GTPase-deficient G α 2 results in translocation of cytoplasmic RGS4 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273**, 18405-18410.

Dulin, N. O., Sorokin, A., Reed, E., Elliott, S., Kehrl, J. H., and Dunn, M. J. (1999). RGS3 inhibits G protein-mediated signaling via translocation to the membrane and binding to G α 11. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 714-723.

Ferguson, K. M., Higashijima, T., Smigel, M. D., and Gilman, A. G. (1986). The influence of bound GDP on the kinetics of guanine nucleotide binding to G proteins. *J. Biol. Chem.* **261**, 7393-7399.

Freissmuth, M., and Gilman, A. G. (1989). Mutations of G α designed to alter the reactivity of the protein with bacterial toxins. Substitutions at ARG187 result in loss of GTPase activity. *J. Biol. Chem.* **264**, 21907-21914.

Gardiner, E. M., Pestonjamasp, K. N., Bohl, B. P., Chamberlain, C., Hahn, K. M., and Bokoch, G. M. (2002). Spatial and temporal analysis of Rac activation during live neutrophil chemotaxis. *Curr. Biol.* **12**, 2029-2034.

Gilman, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615-649.

- Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S. K., Dunican, D., and Knoblich, J. A. (2005). *Drosophila Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. Nat. Cell. Biol.* **7**, 1099-1105.
- Hepler, J. R., Kozasa, T., and Gilman, A. G. (1994). Purification of recombinant Gq alpha, G11 alpha, and G16 alpha from Sf9 cells. *Methods Enzymol.* **237**, 191-212.
- Hepler, J. R., Kozasa, T., Smrcka, A. V., Simon, M. I., Rhee, S. G., Sternweis, P. C., and Gilman, A. G. (1993). Purification from Sf9 cells and characterization of recombinant Gq alpha and G11 alpha. Activation of purified phospholipase C isozymes by G alpha subunits. *J. Biol. Chem.* **268**, 14367-14375.
- Heximer, S. P., Lim, H., Bernard, J. L., and Blumer, K. J. (2001). Mechanisms governing subcellular localization and function of human RGS2. *J. Biol. Chem.* **276**, 14195-14203.
- Hollinger, S., and Hepler, J. R. (2002). Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol. Rev.* **54**, 527-559.
- Hu, G., and Wensel, T. G. (2002). R9AP, a membrane anchor for the photoreceptor GTPase accelerating protein, RGS9-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9755-9760.
- Hubbard, K. B., and Hepler, J. R. (2006). Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal.* **18**, 135-150.
- Itoh, R. E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N., and Matsuda, M. (2002). Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6582-6591.
- Jin, T., Zhang, N., Long, Y., Parent, C. A., and Devreotes, P. N. (2000). Localization of the G protein betagamma complex in living cells during chemotaxis. *Science* **287**, 1034-1036.
- Katada, T., and Ui, M. (1982). Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 3129-3133.

- Kawasaki, T., Taniguchi, M., Moritani, Y., Hayashi, K., Saito, T., Takasaki, J., Nagai, K., Inagaki, O., and Shikama, H. (2003). Antithrombotic and thrombolytic efficacy of YM-254890, a G_{q/11} inhibitor, in a rat model of arterial thrombosis. *Thromb. Haemost.* **90**, 406-413.
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., and Satoh, T. (1991). Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 349-400.
- Kimple, R. J., Kimple, M. E., Betts, L., Sondek, J., and Siderovski, D. P. (2002). Structural determinants for GoLoco-induced inhibition of nucleotide release by G_α subunits. *Nature* **416**, 878-881.
- Klattenhoff, C., Montecino, M., Soto, X., Guzman, L., Romo, X., Garcia, M. A., Mellstrom, B., Naranjo, J. R., Hinrichs, M. V., and Olate, J. (2003). Human brain synembryon interacts with G_α and G_q and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol. *J. Cell Physiol.* **195**, 151-157.
- Kleuss, C., Raw, A. S., Lee, E., Sprang, S. R., and Gilman, A. G. (1994). Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein alpha subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9828-9831.
- Kozasa, T. (2004). Purification of G protein subunits from Sf9 insect cells using hexahistidine-tagged alpha and beta gamma subunits. *Methods Mol. Biol.* **237**, 21-38.
- Lackner, M. R., Nurrish, S. J., and Kaplan, J. M. (1999). Facilitation of synaptic transmission by EGL-30 G_q and EGL-8 PLC β : DAG binding to UNC-13 is required to stimulate acetylcholine release. *Neuron* **24**, 335-346.
- Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1994). Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* **369**, 621-628.
- Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**, 311-319.
- Lin, F., Sepich, D. S., Chen, S., Topczewski, J., Yin, C., Solnica-Krezel, L., and Hamm, H. (2005). Essential roles of G_α_{12/13} signaling in distinct cell behaviors driving zebrafish

convergence and extension gastrulation movements. *J. Cell Biol.* **169**, 777-787.

Malik, S., Ghosh, M., Bonacci, T. M., Tall, G. G., and Smrcka, A. V. (2005). Ric-8 enhances G protein betagamma-dependent signaling in response to betagamma-binding peptides in intact cells. *Mol. Pharmacol.* **68**, 129-136.

Masuho, I., Itoh, M., Itoh, H., and Saitoh, O. (2004). The mechanism of membrane-translocation of regulator of G-protein signaling (RGS) 8 induced by Galpha expression. *J. Neurochem.* **88**, 161-168.

Miller, K. G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J. A., Johnson, C. D., and Rand, J. B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 12593-12598.

Miller, K. G., Emerson, M. D., McManus, J. R., and Rand, J. B. (2000). RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q)alpha signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron* **27**, 289-299.

Miller, K. G., Emerson, M. D., and Rand, J. B. (1999). Goalpha and diacylglycerol kinase negatively regulate the Gqalpha pathway in *C. elegans*. *Neuron* **24**, 323-333.

Miller, R. T., Masters, S. B., Sullivan, K. A., Beiderman, B., and Bourne, H. R. (1988). A mutation that prevents GTP-dependent activation of the alpha chain of Gs. *Nature* **334**, 712-715.

Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Mizuno, N., and Itoh, H. (2004). The adaptor protein Nck1 mediates endothelin A receptor-regulated cell migration through the Cdc42-dependent c-Jun N-terminal kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 34336-34342.

Mukai, H., Munekata, E., and Higashijima, T. (1992). G protein antagonists. A novel hydrophobic peptide competes with receptor for G protein binding. *J. Biol. Chem.* **267**, 16237-16243.

Natochin, M., Gasimov, K. G., and Artemyev, N. O. (2001). Inhibition of GDP/GTP exchange on G alpha subunits by proteins containing G-protein regulatory motifs.

Biochemistry **40**, 5322-5328.

Natochin, M., Lester, B., Peterson, Y. K., Bernard, M. L., Lanier, S. M., and Artemyev, N. O. (2000). AGS3 inhibits GDP dissociation from galpha subunits of the Gi family and rhodopsin-dependent activation of transducin. *J. Biol. Chem.* **275**, 40981-40985.

Neves, S. R., Ram, P. T., and Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science* **296**, 1636-1639.

Nurrish, S., Segalat, L., and Kaplan, J. M. (1999). Serotonin inhibition of synaptic transmission: Galpha(o) decreases the abundance of UNC-13 at release sites. *Neuron* **24**, 231-242.

Reif, K., and Cyster, J. G. (2000). RGS molecule expression in murine B lymphocytes and ability to down-regulate chemotaxis to lymphoid chemokines. *J. Immunol.* **164**, 4720-4729.

Riddle, E. L., Schwartzman, R. A., Bond, M., and Insel, P. A. (2005). Multi-tasking RGS proteins in the heart: the next therapeutic target? *Circ. Res.* **96**, 401-411.

Ross, E. M., and Wilkie, T. M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 795-827.

Sato, M., Ribas, C., Hildebrandt, J. D., and Lanier, S. M. (1996). Characterization of a G-protein activator in the neuroblastoma-glioma cell hybrid NG108-15. *J. Biol. Chem.* **271**, 30052-30060.

Schachter, J. B., Sromek, S. M., Nicholas, R. A., and Harden, T. K. (1997). HEK293 human embryonic kidney cells endogenously express the P2Y1 and P2Y2 receptors. *Neuropharmacology* **36**, 1181-1187.

Schaefer, M., Shevchenko, A., and Knoblich, J. A. (2000). A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **10**, 353-362.

Servant, G., Weiner, O. D., Neptune, E. R., Sedat, J. W., and Bourne, H. R. (1999). Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1163-1178.

Shi, G. X., Harrison, K., Wilson, G. L., Moratz, C., and Kehrl, J. H. (2002). RGS13 regulates germinal center B lymphocytes responsiveness to CXC chemokine ligand (CXCL)12 and CXCL13. *J. Immunol.* **169**, 2507-2515.

Sprang, S. R. (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 639-678.

Srinivasa, S. P., Bernstein, L. S., Blumer, K. J., and Linder, M. E. (1998). Plasma membrane localization is required for RGS4 function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5584-5589.

Sternweis, P. C., and Robishaw, J. D. (1984). Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J. Biol. Chem.* **259**, 13806-13813.

Takasaki, J., Saito, T., Taniguchi, M., Kawasaki, T., Moritani, Y., Hayashi, K., and Kobori, M. (2004). A novel Galphaq/11-selective inhibitor. *J. Biol. Chem.* **279**, 47438-47445.

Takesono, A., Cismowski, M. J., Ribas, C., Bernard, M., Chung, P., Hazard, S., 3rd, Duzic, E., and Lanier, S. M. (1999). Receptor-independent activators of heterotrimeric G-protein signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **274**, 33202-33205.

Tall, G. G., Krumins, A. M., and Gilman, A. G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* **278**, 8356-8362.

Taniguchi, M., Nagai, K., Arao, N., Kawasaki, T., Saito, T., Moritani, Y., Takasaki, J., Hayashi, K., Fujita, S., Suzuki, K., and Tsukamoto, S. (2003). YM-254890, a novel platelet aggregation inhibitor produced by *Chromobacterium* sp. QS3666. *J. Antibiot. (Tokyo)* **56**, 358-363.

Tesmer, J. J., Berman, D. M., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. (1997). Structure of RGS4

bound to AlF_4^- -activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* **89**, 251-261.

Tesmer, V. M., Kawano, T., Shankaranarayanan, A., Kozasa, T., and Tesmer, J. J. (2005). Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex. *Science* **310**, 1686-1690.

Tonissoo, T., Koks, S., Meier, R., Raud, S., Plaas, M., Vasar, E., and Karis, A. (2006). Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. *Behav. Brain Res.* **167**, 42-48.

Tonissoo, T., Meier, R., Talts, K., Plaas, M., and Karis, A. (2003). Expression of ric-8 (synembryn) gene in the nervous system of developing and adult mouse. *Gene Expr. Patterns* **3**, 591-594.

Van Haastert, P. J., and Devreotes, P. N. (2004). Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 626-634.

Von Dannecker, L. E., Mercadante, A. F., and Malnic, B. (2005). Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphaolf. *J. Neurosci.* **25**, 3793-3800.

Wall, M. A., Coleman, D. E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J. A., Posner, B. A., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* **83**, 1047-1058.

Wang, H., Ng, K. H., Qian, H., Siderovski, D. P., Chia, W., and Yu, F. (2005). Ric-8 controls Drosophila neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1091-1098.

Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* **85**, 1159-1204.

Willard, F. S., Kimple, R. J., and Siderovski, D. P. (2004). Return of the GDI: the GoLoco motif in cell division. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 925-951.

Zigmond, S. H. (1977). Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J. Cell. Biol.* **75**, 606-616.

岡本美由紀 (2003) 新規三量体 G タンパク質結合分子である RIC-8 の同定と解析 平成 14 年度修士論文