

活性酸素産生を司る Rac-GEF の
三量体 G タンパク質による制御機構

浦野 大輔

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)

平成二十年 五月 七日

所属 (主指導教員)	細胞内情報学講座 (伊東 広 教授)		
氏名	浦野 大輔	提出	平成 20 年 5 月 7 日
題目	活性酸素産生を司る Rac-GEF の 三量体 G タンパク質による制御機構		
<p>要旨</p> <p>好中球は侵襲障害を受けた臓器組織に他の炎症免疫細胞に先駆けて集積し初期の生体防御反応を行う。好中球は強い貪食能力と殺菌能力を持ち、貪食した細菌を活性酸素やプロテアーゼを用いて死滅させる。活性酸素は過剰に生成されると周辺組織に悪影響を及ぼすが、そうならないために好中球は活性酸素産生の速やかな終息機構や、必要無いときに活性酸素が産生されないよう調節する抑制機構を備えている。活性酸素産生機構や産生抑制機構は三量体 G タンパク質のシグナル伝達経路と密接に関係している。好中球が細菌由来のホルミル化ペプチドなどを認識すると、その受容体の下で三量体 G タンパク質 Gi のβγサブユニット複合体(Gβγ)から phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent RAC exchanger 1 (P-Rex1)、Rac へ繋がるシグナル伝達経路により NADPH オキシダーゼ複合体が活性化され活性酸素が生成される。一方、活性酸素産生の抑制には別の G タンパク質 Gs を介したプロテインキナーゼ A(PKA)の活性化が関係するが、PKA によるリン酸化の標的となるタンパク質を含め不明な点が多い。P-Rex1 は Rac の活性化を促すグアニンヌクレオチド交換因子(Rac-GEF)である。in vitro において P-Rex1 は Gβγにより直接活性化されるが、PKA によるリン酸化で阻害される。Gβγや PKA による P-Rex1 の活性制御は、活性酸素産生の調節に繋がる重要な分子機構であると考えられたため、本研究では P-Rex1 の Gβγによる活性化機構やリン酸化による抑制機構の詳細な解析を行った。</p> <p>P-Rex1 はN末端から DH、PH、二つの DEP (1stDEP、2ndDEP)、二つの PDZ (1st PDZ、2ndPDZ)、IP4P ドメインと多数のドメイン構造を有している。そこで、P-Rex1 の Gβγによる活性化に必要なドメイン構造を調べるため、P-Rex1 の様々な部分欠損変異体やアミノ酸置換変異体を作製し Gβγとの結合および GEF 活性を解析した。まず、免疫沈降法を利用して Gβγと各 P-Rex1 変異体の結合を解析した。続いて in vitro における P-Rex1 の GEF 活性を測定し、各 P-Rex1 変異体の Gβγによる活性化を評価した。哺乳動物細胞内で活性型 Rac は、そのエフェクター分子である p21-activated kinase (PAK) の自己リン酸化、血清応答配列の下流に位置する遺伝子の発現、細胞辺縁部での葉状仮足の形成を促す。そこで HEK293T 細胞や NIH-3T3</p>			

細胞における、これらの Rac 下流シグナルに対する各 P-Rex1 変異体および Gβγ の影響を解析した。これらの解析から、P-Rex1 の IP4P ドメインが定常状態において P-Rex1 自身の 2ndDEP ドメイン及び 1stPDZ ドメインと分子内で相互作用することを示し、このドメイン間相互作用が Gβγ との結合及び Gβγ による活性化に必要なことを明らかにした。また P-Rex1 のドメイン間相互作用には IP4P ドメインの C 末端付近のアミノ酸配列と、1stPDZ ドメインが重要であることを見出した。

PKA は P-Rex1 を直接リン酸化し Gβγ による P-Rex1 の活性化を妨げることが報告されていたが、リン酸化部位や抑制の分子機構は明らかではない。Gβγ による P-Rex1 の活性化には P-Rex1 のドメイン間相互作用が必要なため、PKA は P-Rex1 のドメイン間相互作用を阻害して P-Rex1 の活性化を妨げる可能性を考え解析を行った。まず *in vitro* の実験系でリン酸化を受けた P-Rex1 では Gβγ により GEF 活性が亢進されないこと、Gβγ との結合が弱まることを示し、リン酸化による P-Rex1 の抑制が Gβγ との結合親和性の低下に起因することを示唆した。次に免疫沈降法により PKA が P-Rex1 のドメイン間相互作用、P-Rex1 と Gβγ の結合を阻害することを示した。続いて PKA による P-Rex1 のリン酸化部位を質量分析法により三箇所同定した。P-Rex1 のリン酸化部位は、Rac との結合に係る PH ドメインの β3/β4 ループに存在する 314 番目のセリン(Ser314)、1stDEP ドメイン内の 431 番目のセリン(Ser431)、ドメイン間相互作用に係る 1stPDZ ドメイン内の 650 番目のセリン(Ser650)であった。Ser314 のリン酸化は P-Rex1 と Rac の結合を妨げることで P-Rex1 の活性を抑制し、Ser650 のリン酸化は P-Rex1 のドメイン間相互作用を阻害することで P-Rex1 の活性化を阻害する可能性が考えられた。そこで、P-Rex1 のリン酸化部位の擬似リン酸化型変異体を用いて Gβγ および Rac との結合解析を行った。その結果、Ser650 の擬似リン酸化型変異 (S650E) は Gβγ との結合を弱め、P-Rex1 のドメイン間相互作用を完全に阻害した。Ser314 の擬似リン酸化型変異 (S314E) は Rac との結合を減弱させた。これらの結果から P-Rex1 のリン酸化は、P-Rex1 と Gβγ の結合、P-Rex1 と Rac の結合の両方を妨げるという二段階の活性調節モデルが考えられた。好中球において PKA の活性化は活性酸素産生を抑制することが報告されているが、実際に好中球様に分化させた HL-60 細胞における P-Rex1 の発現と、ホルミル化ペプチド刺激による活性酸素の産生がプロスタグランジン E₂、βアドレナリン作働薬といった PKA の活性化に繋がる細胞外リガンドにより抑制されることを確認した。

本研究により明らかとなった P-Rex1 の活性制御機構は、活性酸素の産生機構と産生抑制機構の分子基盤となるばかりでなく、リン酸化によって Rac-GEF(P-Rex1)がその活性調節因子(Gβγ)と効果器(Rac)の両方と作用できなくなるという全く新しい二段階の抑制機構を提示しており、様々な生理機能を果たすいくつもの GEF の活性制御機構の解明に大いに役立つものと期待される。

< 目次 >

要約	1
序論	5
三量体 G タンパク質	5
好中球による活性酸素産生	6
活性酸素産生を司る Rac-GEF	7
図	10
材料と方法	
実験材料	13
実験方法	18
第一章 Gβγシグナルによる P-Rex1 活性化機構	
背景	26
実験結果	28
Gβγ と P-Rex1 の結合の生化学的解析	28
細胞内での Gβγと P-Rex1 の相互作用	28
P-Rex1 のドメイン間相互作用	29
P-Rex1 のドメイン間相互作用に係るドメイン	29
Gβγと P-Rex1 の結合に及ぼすドメイン間相互作用の役割	30
P-Rex1 の GEF 活性に及ぼす P-Rex1 のドメイン間相互作用の役割	31
PAK リン酸化に及ぼす P-Rex1 のドメイン間相互作用の役割	31
SRE 転写活性に及ぼす P-Rex1 のドメイン間相互作用の役割	32
ラメリポディアの形成に及ぼす P-Rex1 のドメイン間相互作用の役割	33
考察	35
図	37

第二章 Gs シグナルによる P-Rex1 抑制機構	
背景	51
実験結果	52
<i>In vitro</i> における P-Rex1 のリン酸化と GEF 活性	52
細胞内における P-Rex1 の PKA による制御	52
P-Rex1 のリン酸化部位	53
P-Rex1 の 314 番目のセリン残基のリン酸化	53
P-Rex1 の 650 番目のセリン残基のリン酸化	54
好中球の活性酸素産生に対する PKA シグナルの役割	55
考察	58
図	60
結論	72
謝辞	74
引用文献	75

<序論>

1-1 三量体 G タンパク質

三量体 G タンパク質は生体内の様々な臓器組織でホルモン、神経伝達物質、匂い、味、光などの細胞外からの情報を細胞内部へと伝達する役割を担う(Gilman, 1987)。三量体 G タンパク質は $G\alpha$ (39-52 kDa)、 $G\beta$ (35-39 kDa)、 $G\gamma$ (6-8 kDa)から構成され、ヒトゲノムには $G\alpha$ は 16、 $G\beta$ は 5、 $G\gamma$ は 12 種類の遺伝子がコードされている。定常状態では $G\alpha$ に GDP が結合しており $G\beta$ 、 $G\gamma$ と共に不活性型のヘテロ三量体として存在する。G タンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor, GPCR)に細胞外のリガンドが結合すると GPCR が構造変化を起こし $G\alpha$ から GDP を解離させる。すると $G\alpha$ には細胞内の濃度が GDP より約 10 倍高い GTP が結合し、三量体は $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ に解離する。GTP 結合型の $G\alpha$ およびフリーの $G\beta\gamma$ は、各々が効果器を調節して細胞内部へと情報を伝える。その後 $G\alpha$ に結合した GTP は、 $G\alpha$ が持つ GTPase 活性によって加水分解され GDP となる。GDP 型へ戻った $G\alpha$ は再び $G\beta\gamma$ と会合して元の不活性型の三量体フォームへと戻る。

三量体 G タンパク質は 4 種類(G_s 、 G_i 、 G_q 、 G_{12})のファミリーに分類され、それぞれ特異的な標的効果器を介して細胞内セカンドメッセンジャーの産生と分解やイオンチャネルの開閉を促す。 $G\alpha_s$ はアデニル酸シクラーゼを活性化して細胞内部のサイクリック AMP (adenosine 3',5'-cyclic mono-phosphate, cAMP) 濃度を上昇させる。すると cAMP に感受性を示すプロテインキナーゼ A(protein kinase A, PKA)が活性化し、様々な標的タンパク質のリン酸化を介してシグナルが伝達される。 $G\alpha_s$ とは反対に $G\alpha_i$ はアデニル酸シクラーゼの活性を抑制し、 $G\alpha_s$ と拮抗するような生体反応を誘導する。 $G\alpha_q$ はホスホリパーゼ $C\beta$ (phospholipase $C\beta$, $PLC\beta$)を活性化し、ジアシルグリセロール(diacylglycerol, DAG)とイノシトール三リン酸(inositol trisphosphate, IP_3)を産生させる。 IP_3 は小胞体膜上の IP_3 受容体と結合して Ca^{2+} を細胞質へと放出させる。これらはプロテインキナーゼ C(protein kinase C, PKC)などのキナーゼ類を活性化してシグナルを伝達する。 $G\alpha_{12/13}$ は RhoGEF(LARG、p115RhoGEF および PDZ-RhoGEF)の活性化を介してアクチン系細胞骨格の再構築に係る。

$G\beta\gamma$ は G_i と共役した受容体が刺激を受けたとき $G\alpha_i$ と協調して、または $G\beta\gamma$ 単独で効果器を調節する。その効果器は細胞毎、応答毎に異なり広範に渡る。例えば $G\beta\gamma$ はアデニル酸シクラーゼのタイプ I を $G\alpha_i$ と協調して抑制するが、反対にタイプ II、IV、VII を活性化する。また神経細胞や心筋細胞で $G\beta\gamma$ は G タンパク質制御内向き整流 K^+ チャネル (G protein-coupled inwardly rectifying potassium channel,

GIRK)を活性化することで過分極を引き起こす。好中球では $G\beta\gamma$ は $PLC\beta$ の活性化による DAG、 Ca^{2+} シグナルの作動や、phosphatidylinositol-3 kinase γ ($PI3K\gamma$) の活性化による phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP_2)からの phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP_3)の産生を促進する。また $G\beta\gamma$ はリガンド刺激に応じて G protein-coupled receptor kinase (GRK) を膜へと引寄せ、受容体のリン酸化と、それに続く受容体のエンドサイトーシスを促し脱感作に関係する。神経細胞の前シナプスでは P/Q-、N-、R-タイプ Ca^{2+} チャネルを抑制し神経伝達物質の放出を抑制している。このように G_i 共役受容体の機能のいくつかは、 $G\alpha_i$ ではなく $G\beta\gamma$ がその主たるシグナル伝達分子としての役割を担っている。

三量体 G タンパク質は神経系、免疫系、内分泌系、循環器系など広範な生体機能に係り生命の維持に不可欠な分子である。そのため三量体 G タンパク質の研究は古くから多くの興味を集め、細胞内シグナル伝達という新しい研究分野を切り開いてきた(Gilman, 1987)。しかし三量体 G タンパク質に対する理解は未だ十分とは言えず、今後とも三量体 G タンパク質の研究を通じて、様々な生命現象や疾患原因の分子メカニズムがより一層明らかになることが期待される。

1-2 好中球による活性酸素産生

好中球は循環血中に存在する白血球の 50-60%を占め細菌、真菌、ウイルスなどの感染時に他の炎症免疫細胞に先駆けて感染部位に集積し、初期の生体防御反応を行う。好中球は強い貪食能力と殺菌能力を持ち、飲み込んだ細菌を活性酸素(reactive oxygen species, ROS) やプロテアーゼなどを用いて死滅させる。細菌を認識すると好中球内で NADPH オキシダーゼ活性が上昇し、活性酸素が生成され細胞外及び食胞内に放出される。好中球による活性酸素の生成に障害が生じると乳児期より重篤な細菌感染症をきたす。この遺伝性の疾患は慢性肉芽腫症(chronic granulomatous disease)と呼ばれ、NADPH オキシダーゼ複合体($gp91^{phox}$ 、 $p22^{phox}$ 、 $p47^{phox}$ 、 $p67^{phox}$)のいずれかの蛋白質に欠損ないし機能異常が見られる(Heyworth et al., 2003)。このように好中球による活性酸素の産生は生体防御反応に重要な役割を果たすが、一方で活性酸素が過剰に産生されると組織傷害など生体に悪影響をおよぼすと考えられる。そうならないために好中球は活性酸素の産生を速やかに終息させる機構や、必要無いときに活性酸素が産生されないよう調節する抑制機構を備えている(Decoursey and Ligeti, 2005)。

活性酸素の産生や抑制は三量体 G タンパク質を介するシグナル伝達機構と密接に関係している。例えば、原核細菌の産生物である N 末端がホルミル化修飾されたペプチド(formyl peptide)、補体第五因子 C5a (complement component 5a)、炎症

時に好中球や単球が産生するロイコトリエン B₄ (leukotriene B₄, LTB₄)等は Gi と共役した GPCR に作用し活性酸素を産生させる。Gi 共役受容体の下では Gα_i ではなく Gβγが主たるシグナル伝達分子として機能する (図 1)。Gα_i から遊離した Gβγは PLCβを活性化して DAG と IP₃を産生させる(Camps et al., 1992; Katz et al., 1992)。続いて PKC が活性型となり p47^{phox} のリン酸化と膜移行を促進する(El Benna et al., 1994; Rotrosen and Leto, 1990)。p47^{phox} は NADPH オキシダーゼの膜成分である gp91^{phox} や gp22^{phox} と複合体を形成し NADPH オキシダーゼ活性を上昇させる。この PLCβを活性化する経路だけでなく、Gβγは PI3Kγに直接結合しその膜移行を促し PIP₂ から PIP₃を産生させる(Stoyanov et al., 1995)。PIP₃ は Gβγと共に活性酸素産生を司る Rac-GEF である phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent RAC exchanger 1 (P-Rex1)を活性化して、GTP 型の Rac2 を増大させる(Dong et al., 2005; Welch et al., 2002; Welch et al., 2005)。GTP 型の Rac2 は p67^{phox} と結合して膜移行と構造変換を起こさせる(Diekmann et al., 1994)。p67^{phox} は gp91^{phox} や gp22^{phox} と複合体を形成し NADPH オキシダーゼ活性を上昇させる。これらの経路により NADPH オキシダーゼ複合体の細胞膜成分(gp91^{phox}, gp22^{phox})と細胞質成分(p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox})が会合し、NADPH から電子を受け取り酸素分子(O₂)へと付加しスーパーオキシド(O₂⁻)を生成する反応を触媒する。O₂⁻は過酸化水素(H₂O₂)や次亜塩素酸イオン(ClO⁻)あるいはヒドロキシラジカル(.OH)など殺菌力を発揮する様々な活性酸素種の元となる(Werner, 2004)。

一方、イソプロテレノール (isoproterenol) などのβアドレナリン作働薬 (β-agonist) やプロスタグランディン E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂)等は Gs と共役した GPCR に結合し活性酸素産生を抑制する(Decoursey and Ligeti, 2005; Orlic et al., 2002; Sottile et al., 1995; Takenawa et al., 1986)。PGE₂ 受容体やβアドレナリン受容体は Gα_s を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し cAMP 濃度の上昇および PKA の活性化を起こす。この経路における PKA の重要性は阻害剤などを用いた研究から示されていたが、PKA がどのように活性酸素の産生を抑制するのかは明らかではない (図 2)。

1-3 活性酸素の産生を司る Rac-GEF

Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質は、22 種類の遺伝子で構成され、Ras homolog (Rho)、ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac)、cell division cycle 42 (Cdc42) 等のサブファミリーに分けられる。Rho、Rac、Cdc42 は活性型の GTP 結合型と不活性型の GDP 結合型の二つの状態をとり、GTP 型とのみ結合する効果器を介して、アクチン系の細胞骨格の再構築を行う(Hall, 1998)。活性型の Rho はアク

チンストレスファイバーを(Ridley and Hall, 1992)、活性型の Rac は細胞辺縁部で葉状仮足(ラメリポディア、lamellipodia)や膜ラフリングを(Ridley et al., 1992)、活性型の Cdc42 は糸状仮足(フィロポディア、filopodia)を形成させる(Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995)。好中球では Rac はアクチン系細胞骨格の制御に加え、活性酸素の産生に係る。好中球には Rac1 と Rac2 の 2 種類の Rac が発現しているが、活性酸素の産生は Rac2 が担っている。Rac2 欠損マウスから単離した好中球は N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP)刺激による遊走能や活性酸素産生能が低下しており(Li et al., 2002; Roberts et al., 1999)、ヒトにおいても Rac2 の不活性型変異(D57N)が好中球の遊走や活性酸素産生に異常を呈する疾患 (neutrophil immunodeficiency syndrome)で見つかった(Ambruso et al., 2000; Williams et al., 2000)。

Rho、Rac、Cdc42 は、GDP/GTP 交換反応を促進するグアニンヌクレオチド交換因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF)により活性化される(Rossman et al., 2005; Schmidt and Hall, 2002)。Rho ファミリーGTP 結合タンパク質に対する GEF 活性は、癌原遺伝子として知られた Dbl ではじめて報告された(Eva and Aaronson, 1985; Hart et al., 1991)。Dbl の GEF 活性を担う約 200 アミノ酸からなるドメインは Dbl homology (DH)ドメインと呼ばれ、ヒトゲノムには約 70 種類の DH ドメインを有する遺伝子がコードされている。

好中球の細胞質画分に PIP₃を加えると Rac-GEF 活性が上昇することから、PIP₃に感受性を持つ Rac-GEF の存在が想定されていた。P-Rex1 は豚の好中球の細胞質画分から PIP₃に依存した Rac-GEF 活性成分として精製、同定された(Welch et al., 2002)。続いて P-Rex1 の cDNA がクローニングされ、*in vitro* 及び培養細胞を使用した実験系で P-Rex1 の GEF 活性が PIP₃と Gβγより相乗的に促進されることが確かめられた。P-Rex1 はヒトでは 1655 アミノ酸、マウスでは 1650 アミノ酸からなる約 180 kDa のタンパク質で、N 末端から DH ドメイン、Pleckstrin homology (PH)ドメイン、2つの Disheveled/Egl-10/Pleckstrin (DEP)ドメイン、2つの PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ)ドメイン、inositol polyphosphate 4-phosphatase like (IP4P)ドメインを持つ (図 3)。また、P-Rex 遺伝子は無脊椎動物には存在せず、ヒトやマウスなど脊椎動物の多くには P-Rex1 と P-Rex2 という 2 種類の遺伝子が存在する (図 3)。その後の生化学的な解析から、P-Rex1 のドメイン構造のうち PH ドメインは PIP₃による活性化に係ること、DH ドメインは Gβγによる活性化に係ることが報告されている(Barber et al., 2007; Hill et al., 2005)。また、PIP₃および Gβγによる P-Rex1 の活性化には P-Rex1 の膜移行が伴うこと(Zhao et al., 2007)や、Gβおよび Gγの種類の違いによる P-Rex1 活性化に対する感受性の違い(Mayeenuddin et al., 2006)が解析された。更に、Mayeenuddin L.H. and Garrison J.C. は P-Rex1 が PKA によりリン酸化され、その活性が抑制されることを報告した(Mayeenuddin and Garrison, 2006)。P-Rex1 が生体内

で担う役割は P-Rex1 欠損マウスを用いて解析された。P-Rex1 欠損マウスは正常に生まれるが、このマウスから単離した好中球では fMLP や C5a 刺激による活性酸素の産生量が低下しており、P-Rex1 が GPCR の下流で活性酸素の産生に係ることが実証された(Dong et al., 2005; Welch et al., 2005)。以上をまとめると、P-Rex1 は GPCR の下流で Gβγと PIP₃ によって相乗的に活性化され活性酸素の産生に係る分子として知られ、*in vitro* においては P-Rex1 の活性が PKA によるリン酸化で抑制されることが報告されている (図 3B)。

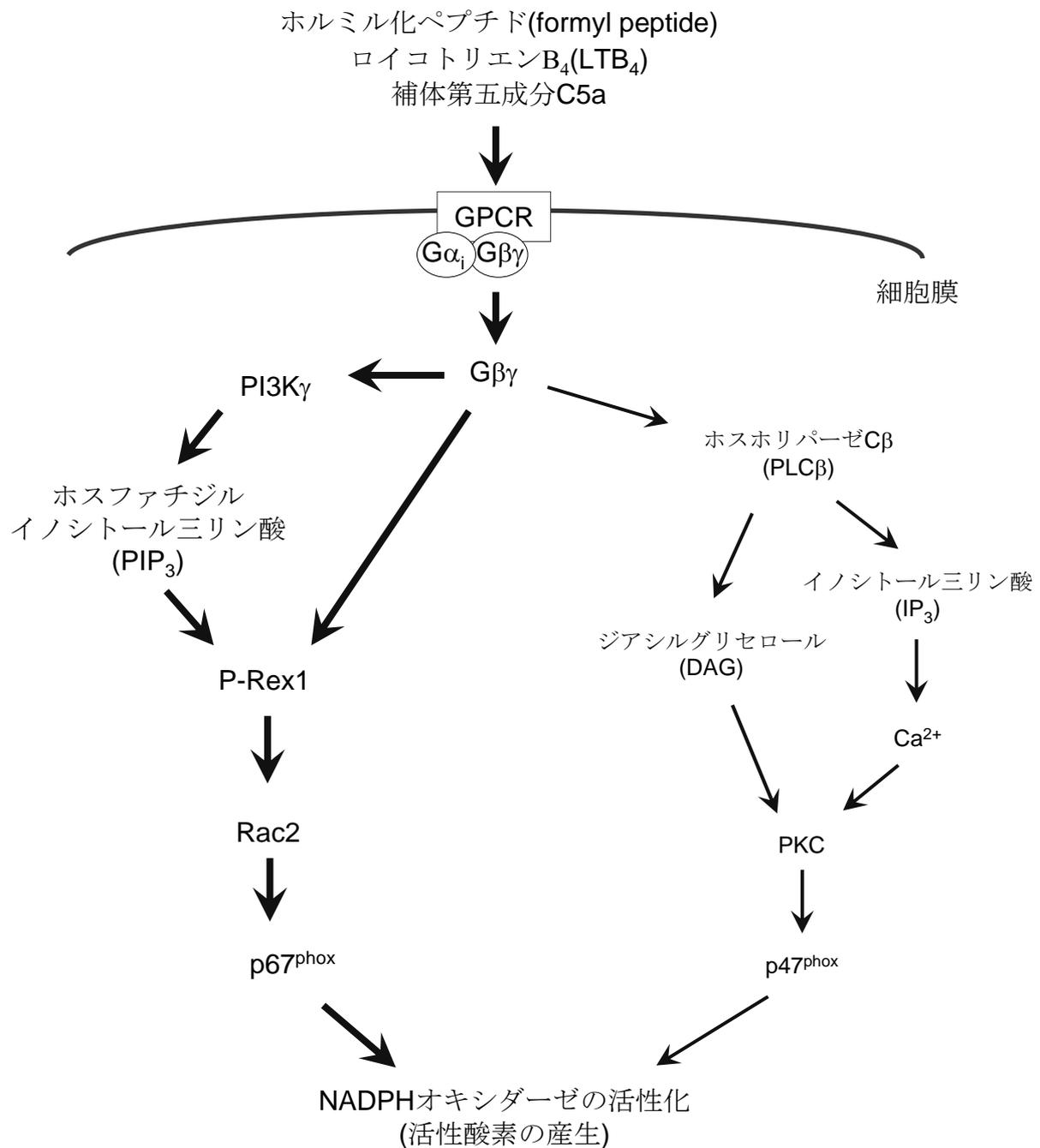


図1 好中球の活性酸素産生に係わる細胞内シグナル伝達経路

Gi共役受容体のアゴニストは好中球による活性酸素の産生を誘導する。受容体の下でGβγが主たるシグナル伝達分子として働きRac2を介する経路(左側)とPKCを介する経路(右側)を作動してNADPHオキシダーゼの活性化に至る。P-Rex1は三量体Gタンパク質のβγ複合体とPIP₃によって直接、相乗的に活性化され、Rac2のGDP/GTP交換反応を促進する。

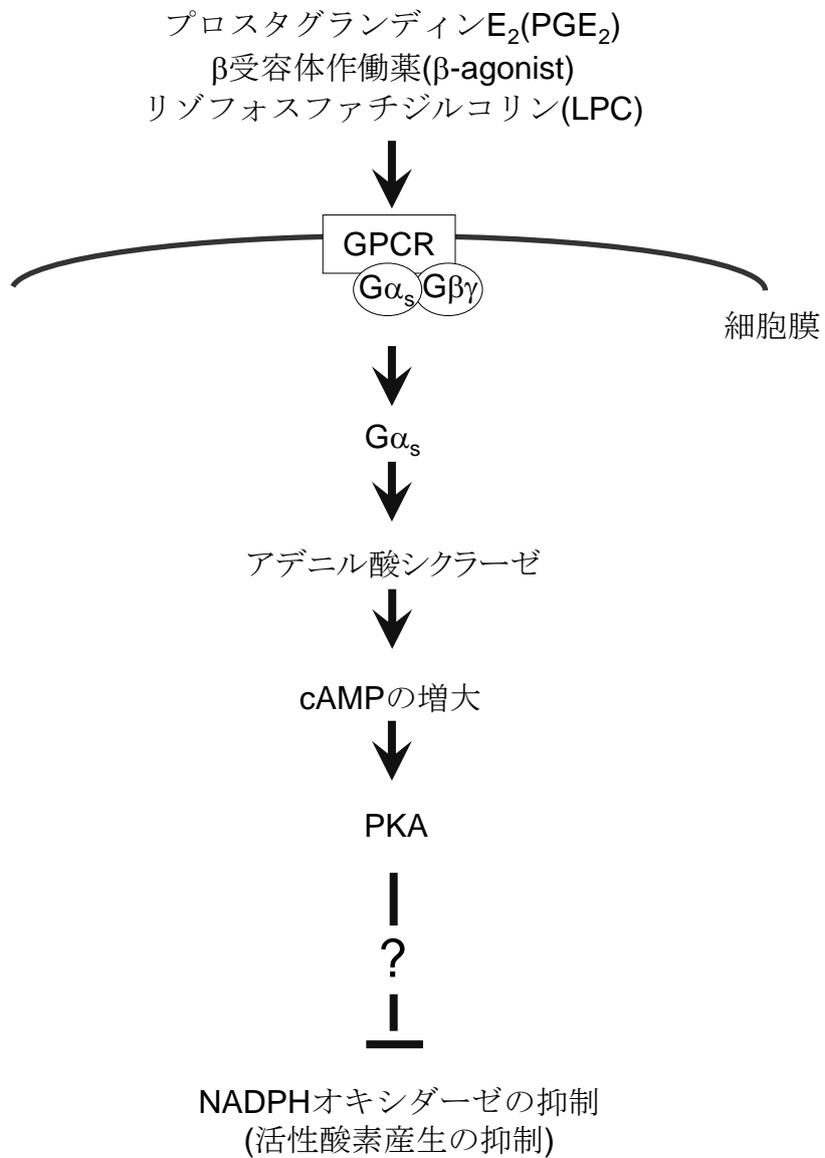


図2 cAMP/PKA経路による活性酸素産生の抑制

Gs共役受容体のアゴニストはfMLP等による活性酸素産生を阻害する。阻害にはPKAのキナーゼ活性が重要だが、PKAの標的分子を含めてPKAが活性酸素の産生を阻害する分子機構については不明な点が多い。

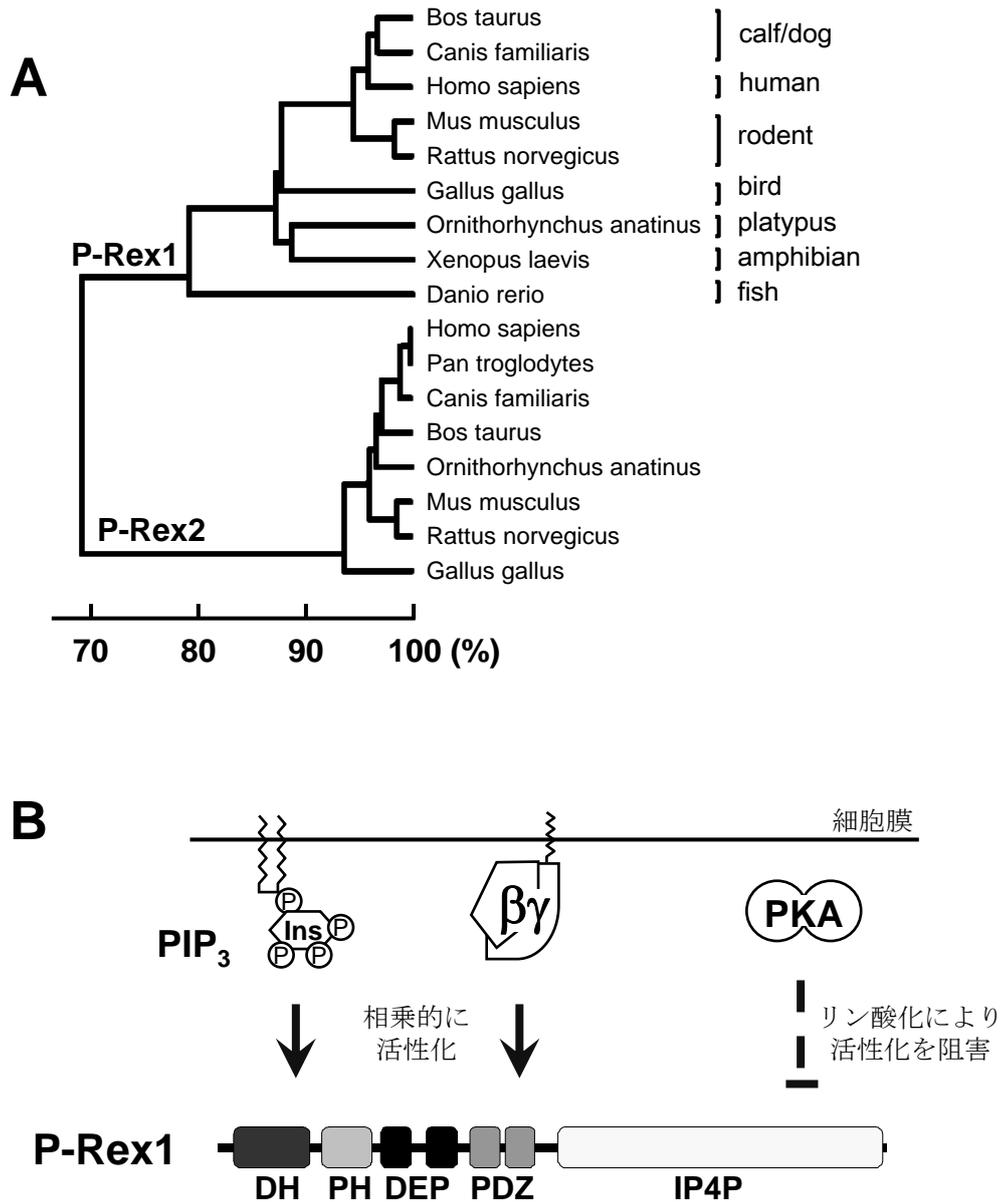


図3 P-Rex1の進化系統樹と活性制御機構

- A) P-Rex1およびP-Rex2の進化系統樹。分岐点のアミノ酸配列の相同性をパーセント表示した。P-Rex遺伝子は脊椎動物に固有であり、線虫やショウジョウバエのゲノムにはコードされていない。
- B) P-Rex1のドメイン構造と活性制御機構。P-Rex1はN末端からDH、PH、1stDEP、2ndDEP、1stPDZ、2ndPDZ、IP4Pと多数のドメイン構造を有する。P-Rex1はGβγとPIP₃によって相乗的に活性化されるが、PKAにリン酸化されると活性化が阻害される。

<材料と方法>

1. 実験材料

1-1 細胞

ヒト胎児腎細胞株 HEK293T 細胞、マウス線維芽細胞株 NIH-3T3 細胞、ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 細胞、*Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞株 Sf9 細胞を使用した。HEK293T 細胞と NIH-3T3 細胞は Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) に 10% 非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS, JRH Biosciences 又は CELLect™)、100 units/ml penicillin G、100 µg/ml streptomycin を加えた培地を用い 37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。HL-60 細胞は RPMI-1640 に 10% FBS、100 units/ml penicillin G、100 µg/ml streptomycin を加えた培地を用い 37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。実験に用いる際には HL-60 細胞を 1.3% DMSO 含む培地で 3 日から 5 日間培養して好中球様に分化させた(Collins et al., 1978; Collins et al., 1979)。Sf9 細胞は Sf-900 II Serum Free Medium に 50 µg/ml gentamicin を加えた培地を用い 27°C、150 rpm で振盪培養した。

1-2 遺伝子発現ベクター

pCMV-Gβ₁、pCMV-Gγ₂、pCMV-FLAG-Gγ₂、pCMV-FLAG-RhoA C.A.、RhoA D.N.、Rac1 C.A.、Rac1 D.N.、Cdc42 C.A.、Cdc42 D.N.、pET-42a-RhoA、Rac1、Cdc42、pEF-renilla luciferase 並びに pSRE-firefly luciferase は既に報告されている発現ベクターを使用した(Nishida et al., 1999; Sun et al., 1999; Yamauchi et al., 1995; Yamauchi et al., 1999)。マウス P-Rex1 の cDNA (mKIAA1415、accession number AK173168) はかずさ DNA 研究所より供与された。pCMV-Myc-P-Rex1 は供与された cDNA から 5'UTR を除き、発現ベクターに組み込んだ。DH/PH、ΔIP4P は 5'UTR を除き、C 末端に終止コドンをつけ加えた DNA 断片を PCR 法により作製して発現ベクターに組み込んだ。P-Rex1 の部分欠損変異体である ΔC34、IP4P、IP4PΔC34、2ndDEP/IP4P、2ndDEP/1stPDZ、2ndDEP、1stPDZ、Ct156 は P-Rex1 の cDNA に含まれる制限酵素認識配列を利用して断片化し発現ベクターに組み込んだ。この方法で作られた変異体は発現ベクターに元々含まれる終止コドンまで翻訳される。P-Rex1 の特定のアミノ酸を置換した変異体である 1stPDZ_{AAAA}、2stPDZ_{AAAA}、ΔIP4P-1stPDZ_{AAAA}、ΔIP4P-2ndPDZ_{AAAA}、DH/PH-S314A、S314E、DH/PH-S314E、S431E、S650A、ΔIP4P-S650A、S650E、ΔIP4P-S650E 並びに TripleE (S314E/S431E/S650E)は QuikChange site-directed

mutagenesis 法 (Stratagene) に従い変異を導入した。pGEX-4T-P-Rex1 antigen は京都大学医学研究科腫瘍生物学講座の吉澤匡人博士、星野幹雄助手の御厚意により頂いた。pCMV-Myc-PKA-C α はラット PKA の触媒サブユニット(PKA-C α)を PCR 法により増幅し発現ベクターに組み込んだ。使用した遺伝子の生物種、accession number 並びに構築した発現ベクターの種類を表にまとめた。また、各 P-Rex1 変異体のアミノ酸配列の境界やアミノ酸置換の変異、構築した発現ベクターの種類を次頁の表にまとめた。Myc や FLAG 等のタグ配列は、いずれもタンパク質の N 末端に融合して発現する。

名前	生物種	Accession number	発現ベクター
G β ₁	bovine	NM_175777	pCMV
G γ ₂	bovine	NM_174072	pCMV, pCMV-FLAG
RhoA	human	NM_001664	pCMV-FLAG, pET-42a
Rac1	human	NM_006908	pCMV-FLAG, pET-42a, pFASTBac HTB
Cdc42	human	NM_001791	pCMV-FLAG, pET-42a
PKA-C α	rat	BC129128	pCMV-FLAG
P-Rex1	mouse	AK173168	pCMV-FLAG, pCMV-Myc, pEGFP, pFASTBac HTC

名前	アミノ酸配列の境界と変異	発現ベクター
P-Rex1	1-1650	pCMV-FLAG, pCMV-Myc, pEGFP pFASTBac HTC
ΔDH	1-41, 248-1650	pCMV-Myc
DH/PH	1-392	pCMV-Myc, pCold I-Myc, pEGFP
ΔIP4P	1-783	pCMV-Myc
IP4P	763-1650	pCMV-Myc, pEGFP
2 nd DEP/1 st PDZ	504-713	pCMV-Myc
1 st PDZ	580-713	pCMV-Myc
2 nd DEP	504-658	pCMV-Myc
1 st PDZ _{AAAA}	1-1650, DYGF629-632AAAA	pCMV-Myc
2 nd PDZ _{AAAA}	1-1650, ALSF713-716AAAA	pCMV-Myc
ΔIP4P-1 st PDZ _{AAAA}	1-783, DYGF629-632AAAA	pCMV-Myc
ΔIP4P-2 nd PDZ _{AAAA}	1-783, ALSF713-716AAAA	pCMV-Myc
ΔC34	1-1616	pCMV-Myc, pEGFP
IP4PΔC34	763-1616	pEGFP
Ct156	1495-1650	pEGFP
2 nd DEP/IP4P	504-1650	pCMV-Myc, pEGFP
S314E	1-1650, S314E	pCMV-Myc
DH/PH-S314A	1-392, S314A	pCold I-Myc
DH/PH-S314E	1-392, S314E	pCold I-Myc
S431E	1-1650, S431E	pCMV-Myc
S650A	1-1650, S650A	pCMV-Myc, pFASTBac HTC
S650E	1-1650, S650E	pCMV-Myc, pFASTBac HTC
ΔIP4P-S650A	1-783, S650A	pCMV-Myc
ΔIP4P-S650E	1-783, S650E	pCMV-Myc
TripleE	1-1650, S314E/S431E/S650E	pCMV-Myc
antigen	224-400	pGEX-4T

1-3 組換えタンパク質

Gβ₁γ₂、His-P-Rex1 および His-Rac1 は Sf9 細胞にバキュロウイルスを感染させる系で発現させた。Gβ₁γ₂ の発現ウイルス、発現条件並びに精製方法は既報に従った(Kozasa and Gilman, 1995)。His-P-Rex1 と His-Rac1 の調製は次のように行った。両タンパク質を発現させるウイルスを Bac-to-Bac バキュロウイルス発現システム (Invitrogen)を利用して作製し Sf9 細胞に感染させた。感染3日後に細胞を回収し Sf9 lysis buffer により溶解させた。次いで 100,000 xg、30 分間の条件で遠心分離を二回行い、上清を Ni-NTA agarose (Qiagen) と共に 4°Cで攪拌した。30 分間以上の攪拌の後 Ni-NTA agarose をミニカラムに移し washing buffer で洗浄した。His-P-Rex1 は 30 mM imidazole を含む elution buffer で洗浄した後、150 mM imidazole を含む elution buffer で溶出した。His-Rac1 は 10 mM imidazole を含む elution buffer で洗浄した後、50 mM 及び 200 mM imidazole を含む elution buffer で溶出した。

Sf9 lysis buffer	20 mM Hepes-NaOH (pH 8.0), 100 mM NaCl, 5mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 10 μM GDP, 1% NP-40 and protease inhibitor cocktail (16 μg/ml TPCK, 16 μg/ml TLCK, 16 μg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 3.2 μg/ml leupeptin, and 3.2 μg/ml lima bean trypsin inhibitor)
washing buffer	20 mM Hepes-NaOH (pH 8.0), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 10 μM GDP, 11 mM Chaps, and protease inhibitor cocktail
elution buffer	20 mM Hepes-NaOH (pH 8.0), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 10 μM GDP, and protease inhibitor cocktail

GST-P-Rex1 antigen、GST-RhoA、GST-Rac1、GST-Cdc42、His/Myc-P-Rex1-DH/PH、DH/PH-S314A 並びに DH/PH-S314E は大腸菌株 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL で発現させた。pCold-I ベクター(Takara Bio Inc.)に組み込んだ His/Myc-P-Rex1-DH/PH、DH/PH-S314A、DH/PH-S314E は 15°C、IPTG 30 μM で 24 時間培養して発現を誘導した。大腸菌を凍結再融解した後 extraction buffer で懸濁し 1 mg/ml のリゾチームを加え氷上で 10 分間静置した。続いてソニケーションにより菌を破砕し 100,000 xg で 30 分間遠心分離を行い未破壊細菌および不溶性画分を除去した。遠心分離した上清を Ni-NTA agarose または Glutathione Sepharose 4B(GE Healthcare Bioscience)と共に 4°Cで攪拌した後、各担体をミニカラムへと移し、ミニカラムを washing buffer を用いて洗浄した。GST-P-Rex1 antigen、RhoA、Rac1、Cdc42 は 20 mM glutathione を含む elution buffer 1 を利用して溶出した。His/Myc-P-Rex1-DH/PH、DH/PH-S314A、DH/PH-S314E は 30 mM imidazole を含む elution buffer 2 を用いてカラムを洗浄した後、100 mM imidazole を含む elution buffer 2 を用いて溶出した。

extraction buffer	50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 1 mM PMSF, and 1 µg/ml leupeptin
washing buffer	extraction buffer with 1 M NaCl
elution buffer 1	100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 140 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 1 mM PMSF, and 1 µg/ml leupeptin
elution buffer 2	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol, 1 mM PMSF, and 1 µg/ml leupeptin

1-4 抗体

anti-Myc、anti-FLAG、anti-GFP、anti-Gβ、anti-PAK1/2/3、anti-phospho-PAK1/2 (anti-phospho-PAK1(Ser199/204)/PAK2(Ser192/197))の各抗体は商用抗体を使用した。抗 P-Rex1 血清は京都大学医学研究科腫瘍生物学講座の吉澤匡人博士、星野幹雄助手の御厚意により頂いた。抗 P-Rex1 血清はマウス P-Rex1 の 224 番目のアラニンから 400 番目のアラニンまでの 177 アミノ酸の GST 融合タンパク質を免疫したウサギから採取した。抗 P-Rex1 抗体の精製は次のように行った。GST-P-Rex1 antigen を共有結合させた Glutathione Sepharose 4B をカラムに積み、抗血清を流してアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。anti-G_{γ2/7} 抗体は愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所神経制御学部の浅野富子室長の御厚意によりいただいた。この抗体は G_{γ7} の C 末端側のアミノ酸配列を抗原としており、G_{γ7} に加え G_{γ2} を認識する(Asano et al., 1995)。使用した抗体を表にまとめた。

名前	免疫動物と種類	販売会社、供与元
anti-Myc	mouse monoclonal (9E10)	BabCO
	rabbit polyclonal (A-14)	Santa Cruz Biotechnology
anti-FLAG	mouse monoclonal (M2)	Sigma-Aldrich
anti-GFP	mouse monoclonal (GF200)	Nacalai Tesque
anti-P-Rex1	rabbit polyclonal	Mikio Hoshino, Masato Yoshizawa
anti-Gβ	rabbit polyclonal (T-20)	Santa Cruz Biotechnology
anti-G _{γ2/7}	rabbit polyclonal	Tomiko Asano
anti-PAK1/2/3	rabbit polyclonal (#2604)	Cell Signaling Technology
anti-phospho-PAK1(Ser199/204)/PAK2(Ser192/197)	rabbit polyclonal (#2605)	Cell Signaling Technology

2. 実験方法

2-1 細胞への遺伝子導入法

HEK293T 細胞にはリン酸カルシウム法で遺伝子を導入した(Chen and Okayama, 1988)。発現プラスミドの量は遺伝子毎、アッセイ毎に異なるが最終 DNA 量は pCMV ベクターを加えることで 6 cm 培養皿 1 枚あたり 10 μg に揃えた。NIH-3T3 細胞には Lipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて遺伝子を導入した。発現プラスミドの DNA 量は 24 ウェルプレートの 1 ウェルあたり 1 μg に揃えた。

2-2 ウェスタンブロッティング

試料に Laemmli sample buffer を加え煮沸し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によりタンパク質を分離した。電気泳動したゲルから Polyvinylidene Fluoride (PVDF) 膜 (Millipore) へ 100 V で 1 時間転写した後、PVDF 膜を blocking buffer 中で室温で 30 分間反応させブロッキングを行った。次いで blocking buffer で希釈した任意の一次抗体と室温 1 時間反応させ、更に Horse radish peroxidase (HRP) 標識された二次抗体 (GE Healthcare Bioscience) と室温 30 分間反応させた。PBST により PVDF 膜を 10 分間、3 回洗浄した後、ECL (GE Healthcare Bioscience) または ECL plus (GE Healthcare Bioscience) と反応させ、X 線フィルムに感光させた。

Laemmli sample buffer 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol,
30 mM DTT and 0.002% bromphenol blue

PBS 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , and 1.5 mM
 KH_2PO_4 (pH 7.4)

PBST PBS with 0.05% Tween-20

blocking buffer PBST with 5% skimmed milk

2-3 免疫沈降 (immunoprecipitation, IP)

HEK293T 細胞 (ϕ 6 cm 培養皿) に遺伝子導入を行い 24 時間後に血清を含まない培地に交換した。更に 24 時間培養したところで培養皿から培地を除去し lysis buffer 0.6 ml を加え氷上で細胞を溶解させた。遠心分離により未溶解画分を除去した上清に anti-Myc 抗体(9E10)や anti-FLAG 抗体(M2) 0.5 μg を加えて 4°C で 2 時間以

上攪拌した。続いて Protein-G Sepharose を加えて 4°C で 30 分間攪拌した後、lysis buffer を用いて 3 回洗浄した。免疫沈降複合体に含まれるタンパク質は SDS-PAGE により分離し、ウェスタンブロッティングにより解析した。

lysis buffer 20 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT,
0.5% NP-40, and protease inhibitor cocktail

2-4 レポーター遺伝子アッセイ

Dual-Luciferase reporter assay system (Promega) の説明書に従った。レポータープラスミドには pSRE-firefly luciferase を、内部標準には pEF-renilla luciferase を使用した。HEK293T 細胞 (96 ウェルプレート) に遺伝子導入を行い 12 時間後に血清を含まない培地に交換した。更に 24 時間培養したところで passive lysis buffer を用いて細胞を溶解した。細胞溶解液に含まれる firefly luciferase と renilla luciferase の活性は化学発光法により測定した。発光強度の測定には 1420 ARVO マルチラベルカウンタ (PerkinElmer Japan) を使用した。firefly luciferase による発光量を renilla luciferase による発光量で除しルシフェラーゼ活性を算出した。レポーター遺伝子と空ベクターのみを遺伝子導入した細胞溶解液のルシフェラーゼ活性を 1 として各条件の活性を相対値で示した。

2-5 PAK リン酸化アッセイ

HEK293T 細胞に遺伝子導入を行い 24 時間後に血清を含まない培地に交換した。更に 24 時間培養したところで 10 µg/ml calyculin A を含む Lysis buffer を用いて細胞を溶解した。遠心分離により未破壊細胞等を除いた上清を SDS-PAGE に供し、タンパク質を分離した。リン酸化された PAK1 並びに PAK2 の検出は anti-phospho-PAK1/2 抗体 (Wong et al., 2000) を用いたウェスタンブロッティングにより行った。細胞溶解液に含まれる PAK1 並びに PAK2 の検出には anti-PAK1/2/3 抗体を使用した。X 線フィルムの画像をスキャナで取り込み、その画像データから NIH-image (National Institute of Health) を使用して各バンドの濃淡を定量した。

2-6 免疫染色

NIH-3T3 細胞を poly-D-lysine (PDL) コートしたカバーグラスに播種した。一晚培養して細胞が接着したところで遺伝子導入を行った。導入の 18 時間後に DMEM

に 0.1% FBS、0.4 mg/ml BSA、100 units/ml penicillin G、100 µg/ml streptomycin を加えた培地に交換した。更に 6 時間培養したところで 5% パラホルムアルデヒドを使用して室温で 20 分間固定した。続いて PBS に 10% FBS と 0.1% Triton X-100 を加えた溶液で 30 分間処理することでブロッキングを行うと共に細胞膜の透過性を上昇させた。次いで一次抗体(anti-FLAG (M2); 1/100, anti-Myc (A-14); 1/100, anti-Myc (9E10); 1/100, anti-Gβ (T-20) 1/100 希釈)を室温 1 時間反応させ PBS で洗浄した後、Alexa488 や Alexa594 標識された二次抗体(Invitrogen, 1/1000 希釈)を室温 30 分間反応させた。アクチン繊維の染色は Alexa Fluor 594 phalloidin (Invitrogen, 1/100 希釈)を二次抗体の反応液に加えて行った。PBS で 3 回洗浄した後スライドガラス上にマウントした。細胞形態の解析と蛍光画像の取得は走査型共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss) を使用して行った。

2-7 *In vitro* キナーゼアッセイ

His-P-Rex1 のタンパク質を PKA (New England Biolabs)と共に PKA buffer 中で 30°C で 2 時間反応させた。反応の停止は Laemmli sample buffer を加え煮沸することで行い、SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。電気泳動後のゲルは CBB 染色を行った後、ゲルドライヤーで乾燥させた。ゲルから放射される X 線はイメージングプレートに記録しイメージングアナライザー(BAS-2500, Fuji Photo Film Co.)を使用して画像データとして読み込んだ。His-P-Rex1 への ³²P の取り込み量はバンドの濃淡を数値化して相対値を示した。

PKA buffer 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 0.5 mM [γ -³²P]-ATP,
0.1 mg/ml BSA, 1 mM PMSF, and 1 µg/ml leupeptin

2-8 GTP γ S および 2'-(or-3')-O-(N-methylanthraniloyl)- β : γ -imidoguanosine 5'-triphosphate, trisodium salt (MANT-GMPPNP) 結合実験

Rac1 への GTP γ S 結合実験は Welch H.E.らの方法を参考に行った(Hill and Welch, 2006; Welch et al., 2002)。まず His-Rac1 を GDP 型にするために、His-Rac1 を GDP loading buffer 中で 25°C で 5 分間反応させた後、マグネシウム濃度が 10 mM になるよう MgCl₂ を添加し 25°C で 15 分間反応させた。2 pmol の GDP 型の His-Rac1 を liposome および 10 pmol の Gβ γ と混合した。次いで HEK293T 細胞から免疫沈降した Myc-P-Rex1 の野生型および変異体、ないしは 1 pmol の His-P-Rex1 組換えタンパク質を混合した。GDP/GTP 交換反応は 30 pmol の [³⁵S]GTP γ S を加えることで開

始した。反応液の容量は 20 μ l とした。続いて反応液に冷却した stop buffer 200 μ l を加え、ニトロセルロース膜 (NC45, Schleicher & Schuell) で濾過し膜に His-Rac1 を吸着させた。膜を stop buffer で 3 回洗浄した後、乾燥させ液体シンチレーションカクテル(Emulsifier Scintillator Plus, PerkinElmer Japan) を加えたプラスチックチューブ(1.5 ml 容量)に入れ、チューブをガラスバイアルに移した。³⁵S の放射線量は液体シンチレーションカウンターLS 6500 (Beckman Coulter)を用いて計測した。His-P-Rex1 のリン酸化は、2.5 units/ μ l PKA を含む PKA buffer 中で 30°C で 2 時間反応させ行った。

MANT-GMPPNP の蛍光を利用した測定法は、Joseph R.E. and Norris R.A.の報告に従った(Joseph and Norris, 2005)。96 ウェル黒色プレートに 1 ウェルあたり終濃度 2 μ M の GST-RhoA, Rac1, Cdc42 を MANT buffer に希釈して加え、続いて終濃度 1 μ M の His/Myc-P-Rex1-DH/PH を添加し反応を開始した。容量は 1 ウェルあたり 55 μ l となるようにした。MANT-GMPPNP に依存した蛍光強度は Mithras LB940 マルチラベルプレートリーダー (Berthold Technologies)を使用して測定した。GST-RhoA、Rac1 あるいは Cdc42 を加えない条件で測定した蛍光強度を 1 として各条件の蛍光強度を相対値で示した。

GDP loading buffer	20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2 mM DTT, and 10 μ M GDP
exchange buffer	20 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), 5 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, and 1 μ g/ml leupeptin
liposome	200 μ M phosphatidyl choline, 200 μ M phosphatidyl serine, 200 μ M phosphatidyl inositol, 0.5 μ M phosphatidyl inositol trisphosphate in exchange buffer (反応液中の終濃度)
stop buffer	20 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), 10 mM MgCl ₂ , and 150 mM NaCl
PKA buffer	50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl ₂ , 0.5 mM ATP, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM PMSF, and 1 μ g/ml leupeptin
MANT buffer	20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 10% glycerol, 400 nM MANT-GMPPNP, 1 mM PMSF, and 1 μ g/ml leupeptin

2-9 表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance, SPR)

BIAcore3000 (Biacore AB)の説明書を参考に行った。実験は SPR running buffer

を使用し 25°C、10 $\mu\text{l}/\text{min}$ の条件で行った。センサーチップはカルボキシルメチルデキストランを金膜表面にコートした CM5 を使用した。CM5 に N-hydroxysuccinimide (NHS)、N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimide)を使用して $\text{G}\beta_{1\gamma_2}$ をアミンカップリングさせた。アナライトとして His-P-Rex を 25、50、100、200、400 nM の 5 種類の濃度で 360 秒間、 $\text{G}\beta_{1\gamma_2}$ が固定されたセンサーチップに流した後、SPR running buffer を 360 秒間流し His-P-Rex1 のセンサーチップからの解離をモニターした。続いて SPR running buffer に 1 M NaCl を加えたバッファーを 30 秒間流してセンサーチップを再生した。非特異的な吸着などによるバックグラウンドとして $\text{G}\beta_{1\gamma_2}$ を固定していない空のセンサーチップに His-P-Rex1 を流したときのセンサグラムと、P-Rex1 を含まないバッファーのみを流したときのセンサグラムを各条件により得られたセンサグラムから減算した。Langmuir (1:1) 結合モデルを使用してフィッティングを行い、結合定数(association constant, k_a)と解離定数(disociation constant, k_d)を決定し、平衡解離定数(equilibrium dissociation constant, K_D)を算出した。

SPR running buffer 10 mM Hepes-NaOH (pH 7.4), 150 mM NaCl, 3 mM EDTA and
0.005% NP-40

2-10 *In vitro* におけるタンパク質結合実験

100 pmol の GST、GST-RhoA、Rac1、Cdc42 と 10 pmol の His/Myc-P-Rex1-DH/PH、DH/PH-S314A、DH/PH-S314E を 333 μl の binding buffer で混合し、Glutathione Sepharose 4B を加えて 4°C で 60 分間攪拌した。次いで binding buffer を用いて Glutathione Sepharose 4B を 3 回洗浄した。Glutathione Sepharose 4B と共に沈降したタンパク質は SDS-PAGE により分離し、ウェスタンブロットティングあるいは CBB 染色により解析した。

binding buffer 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.5% NP-40, and 2 mM
EDTA, 1 mM PMSF, and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin

2-11 質量分析(Mass spectrometry)

His-P-Rex1 100 μg を 12.5 units/ μl PKA と 100 μM ATP を含む reaction buffer 中で反応させた。SDS-PAGE によりタンパク質を分離した後、P-Rex1 に対応するバンドをゲルから切り抜き、トリプシンによりゲル内消化した。消化された P-Rex1 のペプチド断片は、Cap LC システム(Waters)を使用して逆相キャピラリーカラム

(NanoEase Atlantis dc18, 3 μm , 75 μm internal diameter x 150 mm; Waters)により分離し、質量分析装置(nano ESI-Qq-TOF Ultima mass spectrometer; Waters-Micromass) を使用して分析した。分析結果を National Center for Biotechnology Information database の Mascot サーバーを利用して、P-Rex1 の一次構造から予想されるトリプシン消化ペプチドの質量電荷比と照合した。続いて低エネルギー衝突誘起解離によりペプチド主鎖を切断し MS/MS フラグメント解析を行った。MS/MS スペクトルからアミノ酸配列とリン酸化残基を同定した。質量分析装置による解析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の横田直彦研究員に依頼し解析して頂いた。

2-12 活性酸素産生

Luminol の誘導体である L-012 依存性の化学発光を利用して活性酸素種の生成量の経時変化を解析した(Ii et al., 1993; Imada et al., 1999)。好中球様に分化させた HL-60 細胞を ROS buffer で洗浄した後 0.1 mM L-012 を含む ROS buffer で 1 ml あたり 5×10^5 個の細胞になるように懸濁した。96 ウェル白色プレートに 1 ウェルあたり細胞懸濁液を 100 μl 、リガンド溶液(3 μM PGE₂、3 μM isoproterenol、3 μM forskolin/0.3 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) または 600 μM dibutyryl-cyclic AMP (dbcAMP))を 50 μl 添加し 37°C で 10 分間以上刺激した。L-012 に依存した化学発光は 1420 ARVO マルチラベルカウンターを使用して 90 秒間測定した。fMLP 刺激は 1420 ARVO に付属しているポンプから 4 μM fMLP を 50 μl 加え行った。

ROS buffer Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma-Aldrich Japan K.K.) with
50 mM Hepes-NaOH (pH 7.4)

2-13 cAMP の測定

AlphaScreen cAMP Assay Kit (PerkinElmer Japan) の説明書に従った。好中球様に分化させた HL-60 細胞を stimulation buffer で 10 μl あたり 8×10^4 個になるように懸濁し、384 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 10 μl 加えた。続いて 30 μM isoproterenol を含む stimulation buffer を 1 ウェルあたり 5 μl 加え室温、暗所で 30 分間刺激した。細胞内で産生された cAMP を検出するために SA-Donor beads/Biotinated cAMP mixture を 1 ウェルあたり 15 μl 加え室温、暗所で 60 分間反応させた。細胞内の cAMP 産生量は、アクセプタービーズに結合している抗 cAMP 抗体に対して、外因性のビオチン化された cAMP との競合量から算出される。つまり cAMP 産生量に応じて蛍光強度が減弱する。蛍光強度の測定には Fusion α マルチラベルリーダー

(PerkinElmer Japan) を使用した。

Stimulation buffer HBSS with 5 mM Hepes-NaOH (pH 7.4), 1 mg/ml BSA and
0.5 mM IBMX

SA-Donor beads/Biotinated cAMP mixture 5 mM Hepes-NaOH (pH 7.4), 1 mg/ml BSA,
0.3% Tween-20, 66 mU/μl SA-Donor beads,
and 66 mU/μl biotinated cAMP

第一章

Gβγシグナルによる P-Rex1 活性化機構

< 第一章 背景 >

P-Rex1 は *in vitro* 及び細胞内において PIP₃ と Gβγ により相乗的に活性化される (Welch et al., 2002)。P-Rex1 は、N 末端から DH、PH、1stDEP、2ndDEP、1stPDZ、2ndPDZ、IP4P と多数のドメイン構造を有する。DH ドメインは Rac と直接結合し、GDP/GTP 交換反応を促進する。PH ドメインはイノシトールリン脂質との結合に係る。Rho ファミリーの GEF では DH ドメインに続いて PH ドメインが位置しており、この PH ドメインはイノシトールリン脂質との結合に加え DH ドメインと共に GEF 活性に関係する (Rossman et al., 2003; Rossman et al., 2002; Snyder et al., 2002)。DEP ドメインは機能未知のドメイン構造である。いくつかのタンパク質の DEP ドメインは膜移行 (Wong et al., 2000) や他のタンパク質との結合 (Ballon et al., 2006) に係るが、個々のタンパク質に固有の機能と思われる。PDZ ドメインはタンパク質間相互作用に係る。PDZ ドメインは結合タンパク質の C 末端付近のアミノ酸配列と結合するとされた (Kim et al., 1995; Kornau et al., 1995; Sato et al., 1995) が、その後の研究から C 末端付近のアミノ酸配列に限らずより一般的なタンパク質間相互作用に係る例も報告されている (Hillier et al., 1999)。IP4P ドメインはイノシトールリン脂質の 4 位の脱リン酸化酵素と相同性を持つが、その脱リン酸化活性は現在のところ確認されていない (Welch et al., 2002)。

Hill K. らは、P-Rex1 の各ドメインの欠損変異体を作製し *in vitro* における PIP₃ 及び Gβγ による P-Rex1 活性化機構の解析を行った (Hill et al., 2005)。PIP₃ は他の Rho ファミリー GEF の研究結果などから、PH ドメインに作用することが予想されていた。Rho ファミリー GEF の DH/PH ドメインは恒常的活性型変異体として機能することが広く知られているが、PIP₃ は P-Rex1 の DH/PH ドメインだけを含む断片の活性を更に上昇させ、PH ドメイン欠損変異体は活性化しなかった。また、*in vitro* の結合実験においても PIP₃ は P-Rex1 の PH ドメインに結合することが確かめられた。これらの結果から PIP₃ は PH ドメインに作用して P-Rex1 を活性化すると結論付けられた。一方、Gβγ は DH ドメインだけを含む断片の GEF 活性を上昇させたため、DH ドメインに作用すると考えられた (Zhao et al., 2007)。また DEP、PDZ 又は IP4P ドメインの欠損変異体では Gβγ 存在下での GEF 活性が P-Rex1 野生型と比較して低下しており、特に IP4P 欠損変異体では、P-Rex1 野生型の十分の一程度しか活性を示さなかった (Hill et al., 2005)。以上より、P-Rex1 の DH ドメインだけでなく、IP4P ドメインなども P-Rex1 の Gβγ による活性化に係ることが示唆された。また、これらの実験は全て *in vitro* における P-Rex1 の GEF 活性を指標に評価されたものであ

る。P-Rex1 の活性化には P-Rex1 と Gβγとの分子間の結合が不可欠であると考えられるが、Gβγと P-Rex1 の分子間の結合を解析した報告は無い。

第一章では P-Rex1 と Gβγの分子間結合に係るドメイン構造の決定を行い、Gβγによる P-Rex1 の活性化機構との関係を解析した。その結果、P-Rex1 の 2ndDEP/1stPDZ ドメインと IP4P ドメインの間にドメイン間相互作用が存在し、このドメイン間相互作用が P-Rex1 と Gβγの結合、および Gβγによる P-Rex1 活性化に必要であることを明らかにした。

< 第一章 結果 >

1-1. Gβγ と P-Rex1 の結合の生化学的解析

in vitro および細胞内において P-Rex1 の GEF 活性は Gβγ より促進されることが示されていたが、P-Rex1 の活性化に不可欠と考えられる P-Rex1 と Gβγ の結合を詳細に解析した例は無い。そこで表面プラズモン共鳴法を利用して P-Rex1 と Gβγ の直接の分子間結合を解析した (図 4A)。Gβ₁γ₂ の組換えタンパク質を CM5 センサーチップに固定し、5 段階に濃度を振った P-Rex1 の組換えタンパク質をアナライトとして流しセンサグラムを取得した。結合定数(k_a)と解離定数(k_d)をセンサグラムから算出した結果、Gβ₁γ₂ と P-Rex1 の k_a 、 k_d 、および平衡解離定数(K_D)は $2.33 \pm 0.28 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $3.17 \pm 0.85 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.31 \pm 0.27 \times 10^{-7} \text{ M}$ であった。次に P-Rex1 と Gβγ の哺乳動物細胞内での結合の化学量論を解析した (図 4B)。HEK293T 細胞に FLAG タグを付加した P-Rex1 と Gβ₁γ₂ を過剰発現させ、2 回の連続した免疫沈降 (1stIP: FLAG, 2ndIP: Gγ_{2/7}) を行った。初め FLAG-Rex1 を免疫沈降した後、複合体を溶出し、次に Gγ₂ を免疫沈降し、免疫沈降物に含まれる P-Rex1 および Gβ₁γ₂ の量をウエスタンブロッティングにより見積もった。その結果、P-Rex1 と Gβ₁γ₂ の量比 (P-Rex1/Gβ₁γ₂) は 0.5 から 1.0 の間であった。タグの種類を変えて一回目に FLAG-Gβ₁γ₂ を免疫沈降し、2 回目に Myc-P-Rex1 を免疫沈降した実験でも同様の結果が得られた。

1-2. 細胞内での Gβγ と P-Rex1 の相互作用

Gβγ は P-Rex1 の DH ドメインのみから成る断片の Rac-GEF 活性を上昇させる (Zhao et al., 2007)。また、P-Rex1 の IP4P ドメイン欠損変異体(ΔIP4P)は Gβγ 存在下の GEF 活性が野生型と比べ著しく低下する (Hill et al., 2005)。これらの情報から、P-Rex1 と Gβγ の相互作用に DH ドメインや IP4P ドメインに係る可能性が考えられた。そこで、N 末端に Myc タグを付加した P-Rex1 の野生型 (full, 1-1650 aa)、DH/PH(1-392 aa)、DH ドメイン欠損変異体(ΔDH, 1-41, 248-1650 aa)を Gβ₁γ₂ と共に HEK293T 細胞に過剰発現させ anti-Myc 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、Gβγ は Myc-P-Rex1 full、ΔDH とは共沈降したが DH/PH とは共沈降しなかった (図 5 A)。続いて、Myc-ΔIP4P (1-783 aa)、Myc-IP4P (763-1650 aa)を Gβ₁γ₂ と共に HEK293T 細胞に過剰発現させ免疫沈降を行ったが、Gβγ は Myc-ΔIP4P 及び Myc-IP4P どちらも共沈降しなかった (図 5B)。また Myc-ΔIP4P と GFP タグを付加した IP4P ドメ

イン (GFP-IP4P) を共発現させ免疫沈降を行うと、Gβγが Myc-ΔIP4P および GFP-IP4P と共沈降することが示された(図 9、後述)。これらの結果は、P-Rex1 と Gβγとの相互作用にはΔIP4Pを構成するドメインと IP4P ドメインの両方が必要であること、DH ドメインは必ずしも必要ではないことを示唆している。

1-3. P-Rex1 のドメイン間相互作用

図 5 等から Gβγと P-Rex1 の相互作用には P-Rex1-ΔIP4P と P-Rex1-IP4P の両方が必要であり、P-Rex1-ΔIP4P と IP4P ドメインの間に何らかの相互作用が示唆された。そこで、Myc-ΔIP4P と GFP-IP4P を HEK293T 細胞に過剰発現させ anti-Myc 抗体による免疫沈降を行った。その結果、GFP-IP4P が Myc-ΔIP4P と共沈降することを確かめた(図 6, lanes 1 and 2)。続いて、IP4P ドメインの C 末端を欠損した変異体 (GFP-IP4PΔC34, 763-1616 aa)、IP4P ドメインの C 末 156 アミノ酸から成る変異体 (GFP-Ct156, 1495-1650 aa) を Myc-ΔIP4P と共に HEK293T 細胞に過剰発現させ免疫沈降を行った結果、GFP-IP4PΔC34 および GFP-Ct156 は Myc-ΔIP4P と共沈降しなかった (図 6, lanes 3, 4, 5 and 6)。これらの結果は、P-Rex1 の IP4P ドメインがΔIP4P を構成するドメイン群と相互作用すること、その相互作用には IP4P ドメインの C 末端の配列が必要だが十分ではないことを示した。

1-4. P-Rex1 のドメイン間相互作用に係るドメイン

P-Rex1-ΔIP4P は DH、PH、1stDEP、2ndDEP、1stPDZ、2ndPDZ と多数のドメインを持つ。IP4P ドメインとの結合領域を決定するために、Myc-ΔIP4P 及び各部分断片を GFP-IP4P と共に HEK293T 細胞に過剰発現させ、anti-Myc 抗体による免疫沈降を行った。その結果、GFP-IP4P は Myc-ΔIP4P 及び 2ndDEP/1stPDZ (504-713 aa) とは共沈降したが、2ndDEP (504-658 aa) ないし 1stPDZ (580-713 aa) とは共沈降しなかった (図 7A)。このことから、P-Rex1 の IP4P ドメインとの相互作用には 2ndDEP/1stPDZ ドメインから成る領域が必要かつ十分であることが示された。

PDZ ドメインは結晶構造(Doyle et al., 1996)やアミノ酸置換法(Setou et al., 2000)を利用した解析から、分子間結合に重要な部位が決定されている。そこで、P-Rex1 の 1stPDZ ドメインおよび 2ndPDZ ドメインのタンパク質結合部位の 4 残基をアラニン残基に置換した変異体(ΔIP4P-1stPDZ_{AAAA}、ΔIP4P-2ndPDZ_{AAAA})を GFP-IP4P と共に HEK293T 細胞に過剰発現させ、anti-Myc 抗体による免疫沈降を行った。その結果、GFP-IP4P は Myc-ΔIP4P-2ndPDZ_{AAAA} とは共沈降したが、Myc-ΔIP4P-1stPDZ_{AAAA} とは共沈降しなかった (図 7B, lanes 2, 3 and 4)。続いて、Myc-P-Rex1 full および C 末欠

損変異体 (Myc- Δ C34, 1-1616 aa) を GFP-IP4P と共発現させ免疫沈降を行ったところ、GFP-IP4P は Myc- Δ C34 とは共沈降したが、Myc-P-Rex1 full とは共沈降しなかった (図 7B, lanes 5 and 6)。これらの結果から、P-Rex1 のドメイン間相互作用に 1stPDZ ドメインが係ることが明確に示された。また、GFP-IP4P は Myc- Δ C34 と相互作用したが、Myc-P-Rex1 full とは全く相互作用しなかった。この実験結果の一つの説明として、P-Rex1 full では 2ndDEP/1stPDZ ドメインが自身の IP4P ドメインと分子内で相互作用しマスクされ、GFP-IP4P とは相互作用しなかったと考えた。一方、 Δ C34 ではドメイン間相互作用に係る C 末端の配列が欠損しているため、自身の 2ndDEP/1stPDZ がフリーな状態となり GFP-IP4P ドメインと相互作用できたと解釈した。

図 7B から P-Rex1 のドメイン間相互作用は、分子内で形成されると考えられた。しかし、異なる 2 種類のタグ (Myc-, GFP-) を付加した P-Rex1 を HEK293T 細胞に過剰発現させ、anti-Myc 抗体による免疫沈降を行った結果、GFP-P-Rex1 と Myc-P-Rex1 の共沈降が確かめられたため、P-Rex1 のホモ多量体の形成にドメイン間相互作用に係る可能性も考えられた (図 8A, lanes 1 and 2)。そこで、Myc または GFP タグを付加した Δ C34、2ndDEP/IP4P (504-1650 aa) 並びに DH/PH を HEK293T 細胞に発現させ、anti-Myc 抗体による免疫沈降を行った (図 8)。その結果、GFP- Δ C34 および GFP-DH/PH は、Myc- Δ C34、Myc-DH/PH とそれぞれ共沈降したが、GFP-2ndDEP/IP4P は Myc-2ndDEP/IP4P と少しだけ共沈降した。これらの結果から、P-Rex1 は細胞内でホモ多量体を形成することが明らかとなった。また、P-Rex1 のホモ多量体の形成は DH/PH ドメインを介して起こり、IP4P ドメインと 2ndDEP/1stPDZ ドメイン間の相互作用は余り寄与しないことが示唆された。図 7B、図 8 の結果を考え合せると、P-Rex1 のドメイン間相互作用は、恐らく分子内相互作用に係ると考えられた。

1-5. G β γ と P-Rex1 の結合に及ぼすドメイン間相互作用の役割

図 5B により G β γ は P-Rex1- Δ IP4P と P-Rex1-IP4P のいずれかの単独では相互作用しないこと、P-Rex1- Δ IP4P と P-Rex1-IP4P はドメイン間相互作用により細胞内で複合体を形成することが示された。これらの結果から P-Rex1 のドメイン間相互作用が P-Rex1 と G β γ との相互作用に係る可能性が考えられた。そこで、Myc-P-Rex1 full、 Δ IP4P、IP4P、 Δ C34、1stPDZ_{AAAA}、2ndPDZ_{AAAA} を G β γ と共に HEK293T 細胞に過剰発現させ anti-Myc 抗体による免疫沈降を行った (図 9)。P-Rex1 の変異体のうち 1stPDZ_{AAAA} と Δ C34 はドメイン間相互作用が形成されないと考えられる。免疫沈降の結果、G β γ は P-Rex1 full および 2ndPDZ_{AAAA} とは共沈降したが、1stPDZ_{AAAA}、 Δ C34

とは殆ど共沈降しなかった (図 9, lanes 2, 3, 4 and 5)。さらに Gβγは Myc-ΔIP4P、Myc-IP4P と共沈降しないことを図 5B と同様に確かめたが、Myc-ΔIP4P と GFP-IP4P を共発現させ anti-Myc 抗体により免疫沈降を行った結果、Gβγが Myc-ΔIP4P 及び GFP-IP4P と共沈降することが示された (図 9, lanes 6, 7 and 8)。これらの結果から、細胞内での Gβγと P-Rex1 の相互作用には P-Rex1 のドメイン間相互作用が必要であることが示唆された。

1-6. P-Rex1 の GEF 活性に及ぼす P-Rex1 のドメイン間相互作用の役割

P-Rex1 の Rac-GEF 活性は *in vitro* において Gβγと PIP₃により相乗的に促進される (Welch et al., 2002)。まず、His-Rac1、His-P-Rex1 及び Gβ₁γ₂ の組換えタンパク質を利用して、*in vitro* おける His-Rac1 への [³⁵S]GTPγS (加水分解されない GTP のアナログ) の結合を指標に、P-Rex1 の Rac-GEF 活性の Gβγと PIP₃による相乗的な促進効果を確認した。その結果 P-Rex1 は、P-Rex1 単独あるいは Gβ₁γ₂ 存在下、PIP₃ 存在下において Rac1 への GTPγS の結合を殆ど促進しなかったが、Gβ₁γ₂ 及び PIP₃ 共存在下において Rac1 への GTPγS の結合を顕著に亢進した (図 10A)。

続いて P-Rex1 のドメイン間相互作用が Gβγとの相互作用に加え、Gβγによる活性化にも影響を及ぼすか検討した。HEK293T 細胞に Myc-P-Rex1 full、1stPDZ_{AAAA}、2ndPDZ_{AAAA}、ΔC34、ΔIP4P 単独、IP4P 単独あるいは ΔIP4P と IP4P の両方 (ΔIP4P + IP4P) を過剰発現させ、anti-Myc 抗体による免疫沈降により精製した。PIP₃ 存在下で Gβ₁γ₂ 組換えタンパク質の在る条件及び無い条件で Rac-GEF 活性を測定した (図 10B)。その結果、Myc-P-Rex1 full、1stPDZ_{AAAA}、2ndPDZ_{AAAA}、ΔC34、ΔIP4P 単独、ΔIP4P + IP4P は Gβ₁γ₂ を加えない条件で GEF 活性を示した。このうち、P-Rex1 full、2ndPDZ_{AAAA}、ΔIP4P + IP4P は Gβ₁γ₂ を加えた条件で GEF 活性が促進されたが、P-Rex1-ΔC34、ΔIP4P 単独では Gβ₁γ₂ 存在下においても GEF 活性は全く促進されなかった。P-Rex1-1stPDZ_{AAAA} の GEF 活性は有意差は確認できなかったが Gβ₁γ₂ により促進傾向が見られた。P-Rex1-IP4P 単独では Gβ₁γ₂ の有無に係らず、Rac への GTPγS の結合に影響を与えなかった。これらの結果から、*in vitro* において P-Rex1 のドメイン間相互作用が Gβγによる活性化に必要であることが示された。

1-7. p21-activated kinase (PAK) リン酸化に及ぼす P-Rex1 のドメイン間相互作用の役割

PAK はどの組織、細胞にも発現する Rac、Cdc42 の主要なエフェクターであり、Rac、Cdc42 が結合すると PAK 自身による自己リン酸化が起こり活性型となる (Knaus et al., 1995; Manser et al., 1994)。そこで、PAK の自己リン酸化された量をウ

エステンブロットングにより定量し、細胞内における PAK の活性を評価した (図 11)。HEK293T 細胞に P-Rex1 と Gβ₁γ₂ を発現させ細胞内の PAK1 および PAK2 のリン酸化量を解析した結果、P-Rex1 と Gβ₁γ₂ は、Rac1 の恒常的活性型変異体(Rac1 C.A.)と同様に、PAK の自己リン酸化を亢進した (図 11A)。さらに Gβ₁γ₂ と P-Rex1 によって亢進される PAK 自己リン酸化のシグナル特異性を調べるために、RhoA、Rac1、Cdc42 のドミナントネガティブ変異体(RhoA D.N.、Rac1 D.N.、Cdc42 D.N.) を発現させ解析した。その結果、Rac1 D.N.や Cdc42 D.N.は PAK のリン酸化を抑制したが、RhoA D.N.は PAK のリン酸化に影響を与えなかった。これらの結果から、P-Rex1 と Gβ₁γ₂は細胞内において PAK の自己リン酸化を亢進すること、P-Rex1 と Gβ₁γ₂による PAK の自己リン酸化は Rac や Cdc42 を介して起こることが示唆された。また、この結果は *in vitro* において P-Rex1 が Rac1 と Cdc42 の GDP/GTP 交換反応を促進するが、RhoA に対しては影響を与えないとの報告(Welch et al., 2002)とよく一致している。

in vitro のにおいて P-Rex1 のドメイン間相互作用が Gβ₁γ₂による活性化に必須であったことから、細胞内での P-Rex1 の活性化にもドメイン間相互作用が必要であることが考えられた。そこで、P-Rex1 の各変異体を使用して、P-Rex1 と Gβ₁γ₂が引き起こす PAK の自己リン酸化への P-Rex1 のドメイン間相互作用の重要性を解析した。HEK293T 細胞に P-Rex1 full、ΔIP4P 単独、IP4P 単独あるいはΔIP4P と IP4P の両方(ΔIP4P + IP4P)を過剰発現させ PAK1 および PAK2 の自己リン酸化を評価した (図 11B, 11C, 11D)。P-Rex1 full やΔIP4P + IP4P を過剰発現させた条件において、PAK1 と PAK2 の自己リン酸化の亢進が見られ Gβ₁γ₂ の共発現により PAK1 および PAK2 の自己リン酸化量が増大した。一方、P-Rex1-ΔIP4P 単独、P-Rex1-IP4P 単独は PAK 自己リン酸化を顕著には誘導せず、Gβ₁γ₂ による促進効果も有意には確認されなかった。これらの結果は、細胞内において P-Rex1 のドメイン間相互作用が Gβ₁γ₂による活性化に重要であることを示唆している。

1-8. SRE 転写活性に及ぼす P-Rex1 のドメイン間相互作用の役割

哺乳動物細胞内で活性型の Rho、Rac、Cdc42 は SRE 下流の遺伝子の転写量を増加させる(Hill et al., 1995; Miralles et al., 2003)。そこで、PAK 以外の Rac 下流のシグナル伝達経路にも、P-Rex1 のドメイン間相互作用が影響を及ぼすか調べるため、SRE 下流の遺伝子発現量をレポーター遺伝子アッセイにより解析した。P-Rex1 と Gβ₁γ₂ を HEK293T 細胞に共発現させることで SRE 下流のレポーター遺伝子の発現量の増加が確認されたことから、まずシグナルの特異性を解析するために RhoA、Rac1 並びに Cdc42 のドミナントネガティブ変異体 (RhoA D.N.、Rac1 D.N.、Cdc42

D.N.) を遺伝子導入し、その効果を解析した (図 12A)。その結果、P-Rex1 と Gβ₁γ₂ によるレポーター遺伝子の発現量増加は Rac1 D.N. でほぼ完全に、Cdc42 D.N. で部分的に解除されたが、RhoA D.N. では特に変化しなかった。

次に、各 P-Rex1 変異体を単独で、又は Gβ₁γ₂ と共に HEK293T 細胞に過剰発現させ解析を行った (図 12B)。P-Rex1-ΔIP4P は単独発現によるレポーター遺伝子の発現は見られたが、Gβ₁γ₂ による相乗的な促進効果を示さなかった。P-Rex1-ΔIP4P と IP4P の共発現は SRE 下流のレポーター遺伝子の発現を誘導し、Gβ₁γ₂ 共発現により相乗的な発現量の増大が見られた。P-Rex1-IP4P は単独ではレポーター遺伝子の発現は起こらず、Gβγ による促進効果も確認されなかった。これらの結果から、P-Rex1 と Gβγ による相乗的な SRE の下流遺伝子の発現量増加には、P-Rex1 のドメイン間相互作用が必要であることが示された。このことも細胞内における P-Rex1 の Gβγ による活性化において P-Rex1 のドメイン間相互作用が重要な役割を果たすことを示唆している。

1-9. 細胞辺縁部のラメリポディア形成に及ぼす P-Rex1 のドメイン間相互作用の役割

Rac は細胞辺縁部でアクチン繊維を集積させラメリポディア(葉状仮足)や膜ラフリングを形成させる(Ridley et al., 1992)。そこで、NIH-3T3 細胞を使ってラメリポディアの形成と、それに伴う細胞形態の変化を指標に、P-Rex1 と Gβγ に依存した Rac の活性化を評価した。NIH-3T3 細胞に Myc-P-Rex1 と Gβ₁γ₂ を過剰発現させた後、免疫染色を行い細胞形態と細胞内のアクチン繊維を顕微鏡で観察した。その結果、Myc-P-Rex1 と Gβ₁γ₂ を過剰発現させた細胞は特徴的な丸い広がった細胞形態を示し、細胞辺縁部に円弧状の長いラメリポディアの形成が見られた (図 13)。次に、RhoA、Rac1、Cdc42 の恒常的活性型変異体(RhoA C.A.、Rac1 C.A.、Cdc42 C.A.)を NIH-3T3 細胞に過剰発現させ同様に免疫染色を行った。その結果、RhoA C.A. を発現した細胞ではアクチンストレスファイバーの形成が、Cdc42 C.A. を発現した細胞ではフィロポディアの形成が、Rac1 C.A. を発現させた細胞では辺縁部の全域にわたりラメリポディアの形成が観察された (図 14)。これらの結果から、P-Rex1 は *in vitro* では Rac1 と Cdc42 両方の GEF として機能するが、NIH-3T3 細胞においては P-Rex1 と Gβγ は、活性型 Rac1 と同様に細胞辺縁部のラメリポディアの形成を誘導することが示された。

次に、各 P-Rex1 変異体を単独で、又は Gβ₁γ₂ と共に NIH-3T3 細胞に過剰発現させ、免疫染色により解析を行った。その結果、P-Rex1-ΔIP4P 単独、IP4P 単独では Gβγ の共発現の有無に係らず、円弧状にラメリポディアを持つ細胞は観察されなかった。P-Rex1 全長を発現、あるいは ΔIP4P と IP4P を共発現 (ΔIP4P + IP4P) させ

た細胞では、辺縁部全体に渡って円弧状の長いラメリポディアを有する細胞が観察され、 $G\beta_1\gamma_2$ との共発現により、そのような細胞の割合が顕著に増加した (図 15A)。遺伝子導入が確認された細胞のうち、円弧状に広がったラメリポディアを形成した細胞の割合は、P-Rex1 全長と $G\beta_1\gamma_2$ の共発現で 62%、 $\Delta IP4P + P-Rex1$ と $G\beta_1\gamma_2$ の共発現で 55%であった (図 15B)。

<第一章 考察>

第一章では、P-Rex1 の Gβγによる活性化に係るドメイン構造の解明を目指し解析を行った。その結果、(1) P-Rex1 は IP4P ドメインと 2ndDEP/1stPDZ ドメインの間にドメイン間相互作用を持つこと、(2) P-Rex1 のドメイン間相互作用が P-Rex1 と Gβγの相互作用に必要であること、(3) P-Rex1 のドメイン間相互作用は *in vitro* および細胞内における Gβγによる P-Rex1 の活性化に必要であること、(4) ドメイン間相互作用はおそらく P-Rex1 の分子内の相互作用に係ること、(5) P-Rex1 は細胞内でホモ多量体を形成すること、(6) ホモ多量体の形成はおそらく DH/PH ドメインを介して起こることを明らかにした。

図 6 および図 7 では P-Rex1 の 2ndDEP/1stPDZ ドメインと IP4P ドメインが相互作用することを様々な変異体を使用して明確に示した。さらに、1stPDZ ドメインのアミノ酸置換変異体(ΔIP4P-1stPDZ_{AAAA})、IP4P ドメインの C 末端欠損変異体(IP4PΔC34)を使用した解析から、1stPDZ ドメインと P-Rex1 の C 末端のアミノ酸配列が、このドメイン間相互作用に必要であることを示した (図 6, 図 7B)。PDZ ドメインはタンパク質の C 末端付近のアミノ酸配列を認識して結合することが知られ、今回の実験結果と良く一致する。しかし IP4P ドメインの C 末端配列を含む断片(Ct156)は P-Rex1-ΔIP4P とは結合しなかった (図 6)。P-Rex1 の C 末端配列は典型的な PDZ ドメイン結合モチーフを保持しておらず、P-Rex1 の 1stPDZ ドメインの分子間結合に係る部位の配列も、PSD-95 などの典型的な PDZ ドメインとは異なる。PDZ ドメインは C 末端配列との結合だけでなく、一般的なタンパク質間の結合にも係るため、1stPDZ ドメインが IP4P ドメインの C 末端配列以外を認識する可能性も考えられる。また、図 7A では、2ndDEP ドメインも IP4P ドメインとの相互作用に必要であることを示した。DEP ドメインがタンパク質間相互作用に係る例も報告されているが、DEP ドメインがどのように IP4P ドメインとの相互作用に係るかは更なる検討が必要と考えられる。

図 8A では、細胞内において P-Rex1 がホモ多量体を形成することを示した。そのため、P-Rex1 の 2ndDEP/1stPDZ ドメインと IP4P ドメインの相互作用が分子間のホモ多量体形成に係る可能性と、P-Rex1 分子内の相互作用に係る可能性が考えられた。P-Rex1 の DH/PH ドメインのみを含む断片(DH/PH)や、ドメイン間相互作用に重要な C 末端を欠損させた変異体(ΔC34)がホモ多量体を形成したこと、ドメイン間相互作用に必要な 2ndDEP ドメインから IP4P ドメインを含む変異体(2ndDEP/IP4P)はホモ多量体形成量が減弱したことから、2ndDEP/1stPDZ ドメインと

IP4P ドメインの相互作用は主に分子内の相互作用に係ることが考えられた。しかし 2ndDEP/IP4P 変異体も少ないながらもホモ多量体を形成しており、2ndDEP/1stPDZ ドメインと IP4P ドメインとの相互作用が多量体形成に寄与している可能性も完全には拭い去れない。P-Rex1 のドメイン間相互作用が分子内相互作用に寄与することを的確に示すためには、免疫沈降だけでなく密度勾配遠心分離やネイティブ PAGE 等の手法を利用することが望ましい。

P-Rex1 以外の Rho ファミリー-GEF でもホモ多量体を形成する例がある。癌原遺伝子の Dbl は P-Rex1 と同様に DH ドメインを介してホモ二量体を形成する (Zhu et al., 2001)。Dbl の DH/PH ドメインは恒常的活性型変異体として機能するが、DH ドメインを介したホモ二量体形成が GDP/GTP 交換促進活性、NIH-3T3 細胞のトランスフォームに不可欠である。これらの情報から、P-Rex1 の DH/PH ドメインを介したホモ多量体形成も、Rac-GEF 活性に必須である可能性も考えられる。Dbl のホモ二量体形成に係る部位はアミノ酸レベルで決定されており、P-Rex1 においても同部位の変異により GEF 活性に変化が見られるかは興味深い。また、 α -Pix/Cool-2 や β -Pix/Cool-1 では C 末側のロイシンジッパー構造を介してホモ二量体を形成する (Feng et al., 2004)。 α -Pix/Cool-2 は単量体では Cdc42-GEF として機能するが、ホモ二量体では Rac-GEF 活性を示し基質特異性が変化する。Rho ファミリー-GEF の多量体化と活性制御の関係は、Rho ファミリー-GEF 全体の研究課題として残っており今後の研究が待たれる。

P-Rex2 は P-Rex1 と同様のドメイン構造を有し PIP₃ と G β γ によって相乗的に活性化される。ヒトでは P-Rex2 の IP4P ドメインを持たないスプライズバリエント (P-Rex2b) の発現が報告されている (Donald et al., 2004; Rosenfeldt et al., 2004)。Rosenfeldt H. らは、P-Rex2b は Gi 共役受容体に対するリガンド処理により活性化されることを示した。P-Rex2b は IP4P ドメインを持たないため、2ndDEP/1stPDZ ドメインと IP4P ドメインの相互作用が起こらないと考えられる。この変異体が GPCR の下流でどのように活性化されるのか興味深い。

第一章では様々な変異体を利用して、P-Rex1 の G β γ による活性化機構の解明を目指し、一定の成果を挙げた。しかし、変異体の作製による活性化機構の解析では、ドメインの欠損やアミノ酸置換によって、元々考えた以外にも構造および機能的障害が生じ、結果に影響を及ぼす可能性は否定できない。P-Rex1 の組換えタンパク質は Sf9 細胞とバキュロウィルスを使用した発現系で培養液 1 l あたり 10 mg 程度発現する。組換えタンパク質が大量に発現できる利点を生かし P-Rex1 の結晶構造、そして G β γ および Rac と P-Rex1 の共結晶構造解析を行い、第一章で提唱した活性化モデルをより堅牢なものとしていきたい。

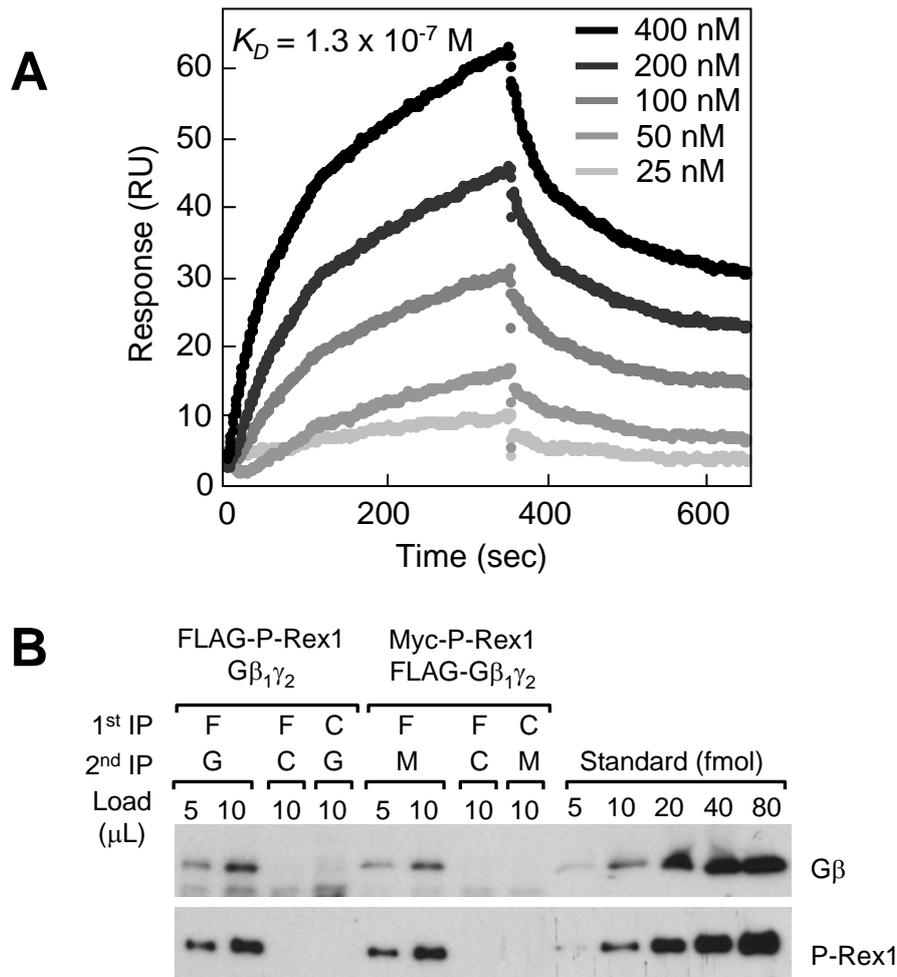


図4 P-Rex1とGβγの結合の生化学的解析

- A) 表面プラズモン共鳴によるP-Rex1とGβγの平衡解離定数(K_D)の解析。Gβ₁γ₂を固定したセンサーチップに、五通りに濃度を振ったP-Rex1 (25, 50, 100, 200, 400 nM)をアナライトとして流した。得られたセンサグラムからバッファーのみを流した際のセンサグラム、空のセンサーチップにP-Rex1を流した際のセンサグラムを減算した。三回の独立した実験を行い平均をグラフに示した。 k_a , k_d および K_D は $2.33 \pm 0.28 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $3.17 \pm 0.85 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.31 \pm 0.27 \times 10^{-7} \text{ M}$ であった。
- B) 細胞内でのP-Rex1とGβγの結合の化学量論。HEK293T細胞にGβ₁γ₂とP-Rex1を図中に記載した通りに過剰発現させ、遺伝子導入の48時間後に細胞を回収し二回の連続した免疫沈降を行った。ライセートからanti-FLAG抗体を使用して免疫沈降(1st IP; F(anti-FLAG), C (control IgG))を行った後、FLAGペプチドを使用して免疫沈降複合体を溶出した。続いてanti-Mycまたはanti-Gγ₂₇抗体を使用して二回目の免疫沈降(2nd IP; G(anti-Gγ₂₇), M(anti-Myc), C(control IgG))を行い、P-Rex1とGβγを含む複合体を精製しウエスタンブロットによりP-Rex1とGβ₁γ₂の結合の化学量論を解析した。両タンパク質量を見積もるためのスタンダードはSf9細胞で発現させ精製したHis-P-Rex1, Gβ₁γ₂の組換え蛋白質を使用した。二回の独立した実験を行い同様の結果が得られた。

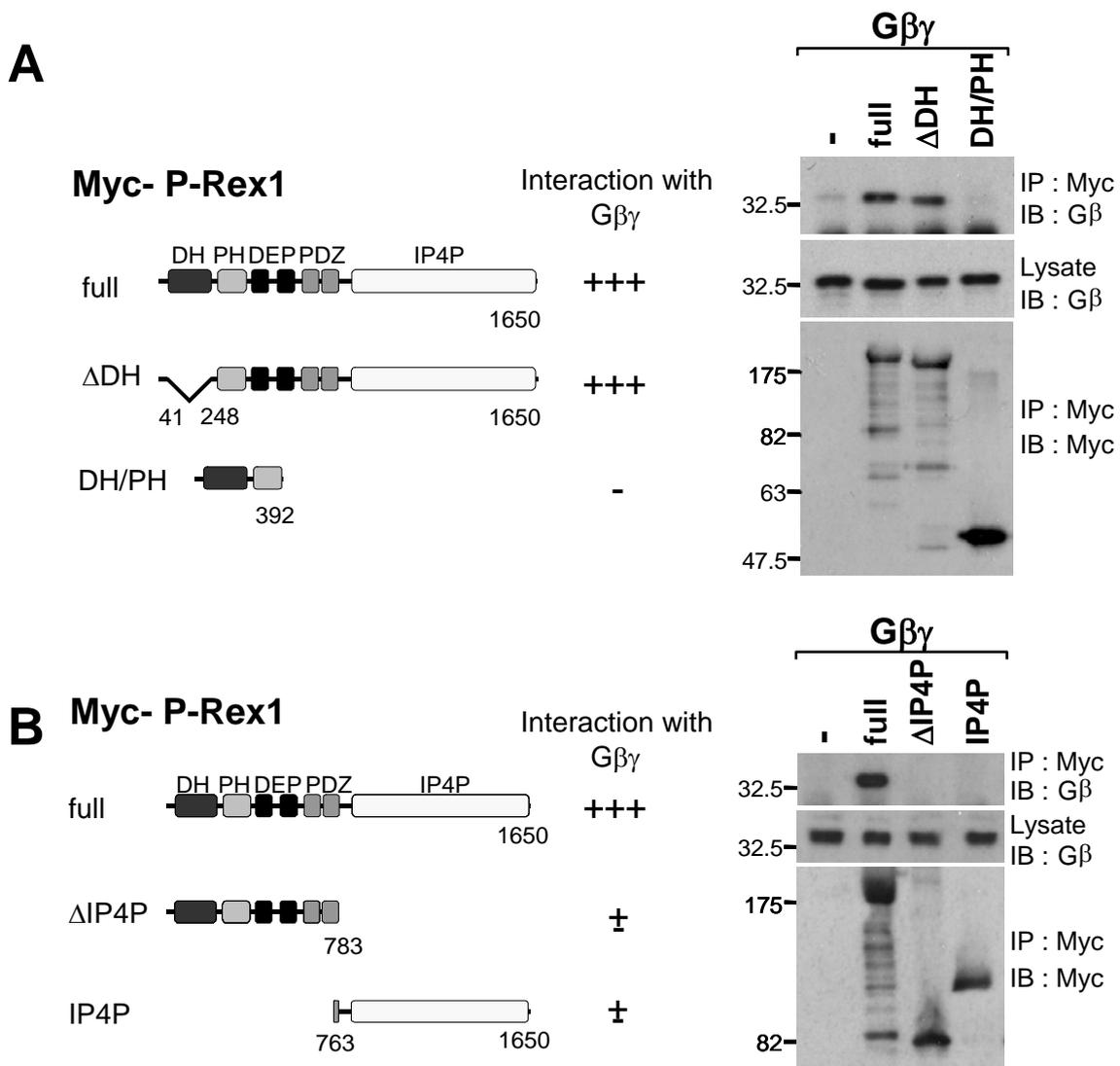


図5 細胞内での $G\beta\gamma$ とP-Rex1の相互作用

A.B) HEK293T細胞に $G\beta_1\gamma_2$ とMyc-P-Rex1全長または変異体を図中に記載した通りに過剰発現させ、48時間後に細胞を回収してanti-Myc抗体による免疫沈降を行った。左側には細胞に導入したMyc-P-Rex1全長および変異体の模式図、アミノ酸配列の境界並びに実験結果の概要を示した。右側のウエスタンブロットでは細胞ライゼート(Lysate)と免疫沈降物(IP:Myc)に含まれる $G\beta$ とMyc-P-Rex1を示した。三回以上の独立した実験を行い、その全てにおいて同様の結果が得られた。

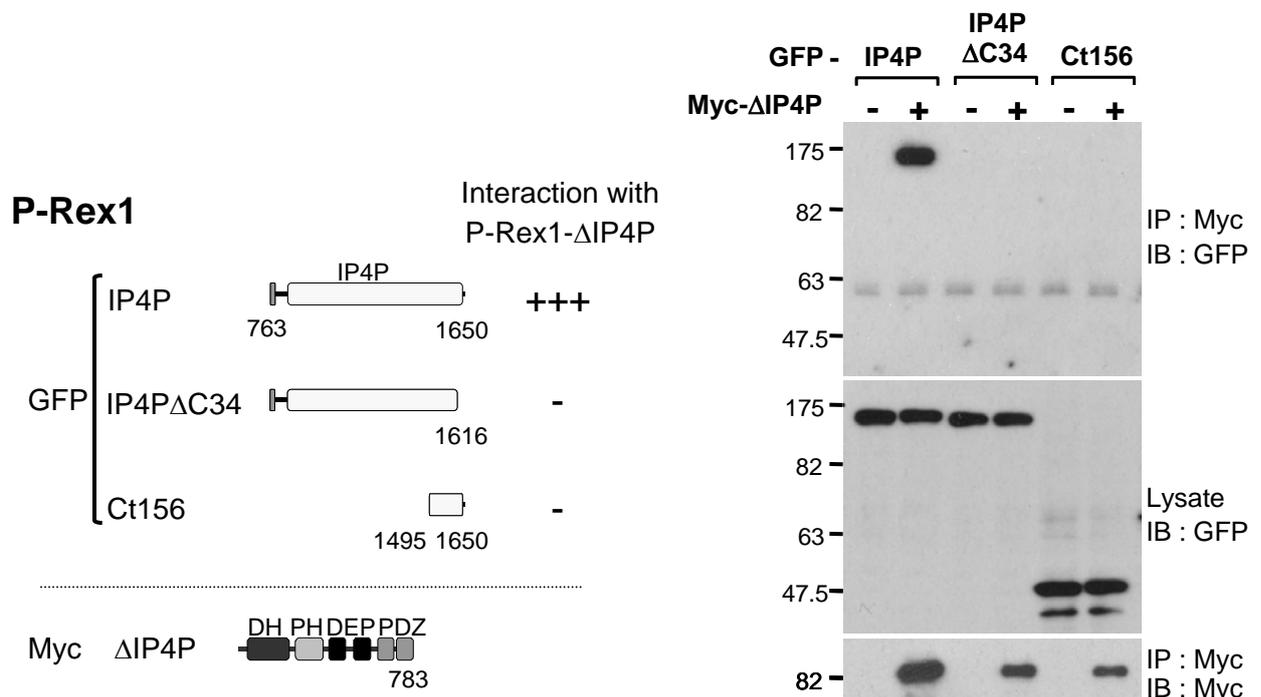


図6 P-Rex1のドメイン間相互作用

HEK293T細胞にMyc-P-Rex1並びにGFP-P-Rex1の変異体を図中に記載した通りに過剰発現させ、48時間後に細胞を回収してanti-Myc抗体による免疫沈降を行った。左側には細胞に導入したP-Rex1の変異体の模式図、アミノ酸配列の境界並びに実験結果の概要を示した。右側のウェスタンブロットでは細胞ライセート(Lysate)と免疫沈降物(IP:Myc)に含まれる各P-Rex1変異体を示した。三回以上の独立した実験を行い、その全てにおいて同様の結果が得られた。

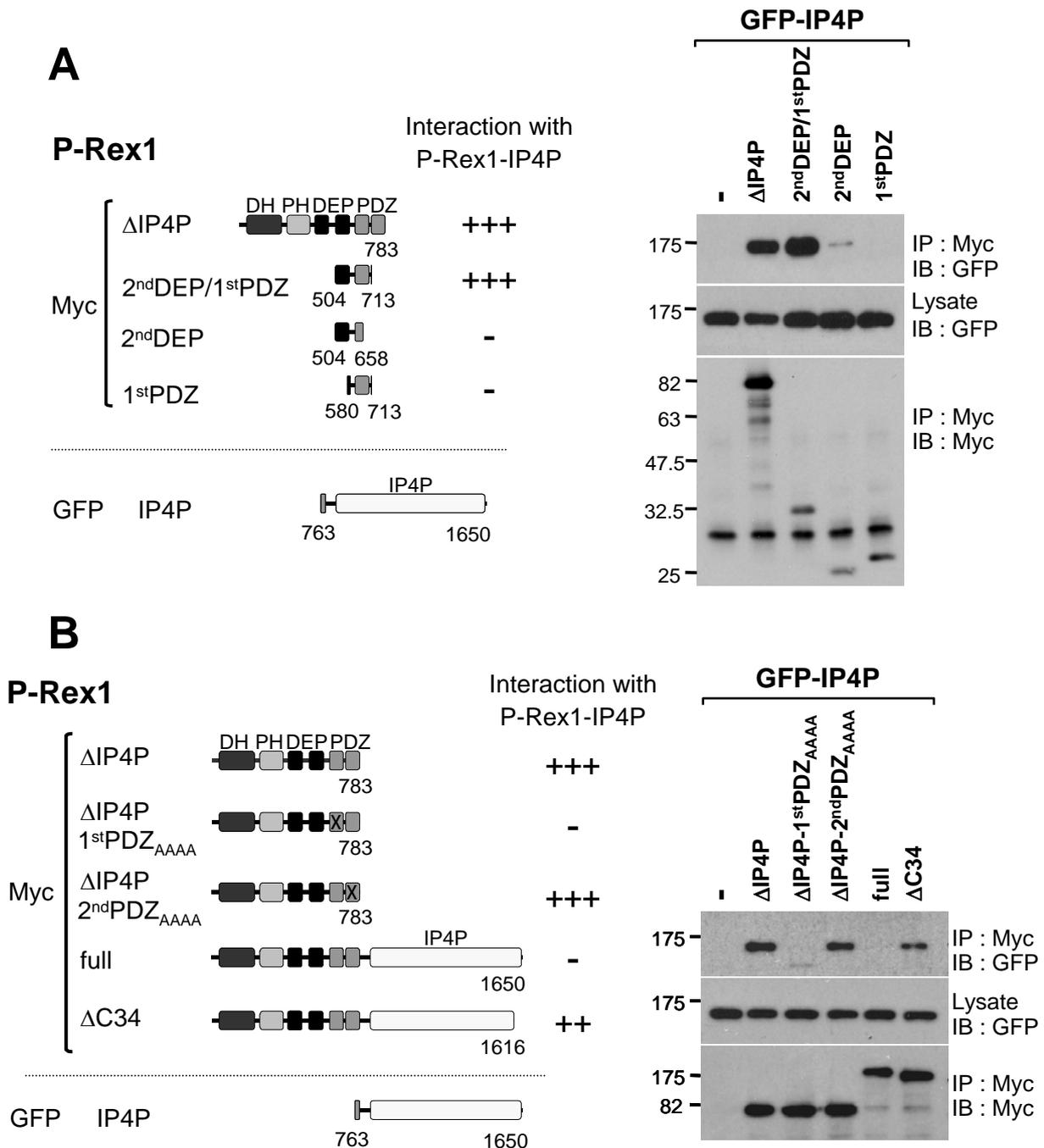


図7 P-Rex1のドメイン間相互作用に係るドメイン

A.B) HEK293T細胞にMyc-P-Rex1並びにGFP-P-Rex1の変異体を図中に記載した通りに過剰発現させ、48時間後に細胞を回収してanti-Myc抗体による免疫沈降を行った。左側には細胞に導入したP-Rex1全長および変異体の模式図、アミノ酸配列の境界並びに実験結果の概要を示した。右側のウエスタンブロットでは細胞ライゼート(Lysate)と免疫沈降物(IP:Myc)に含まれるP-Rex1全長及び変異体を示した。三回以上の独立した実験を行い、その全てにおいて同様の結果が得られた。

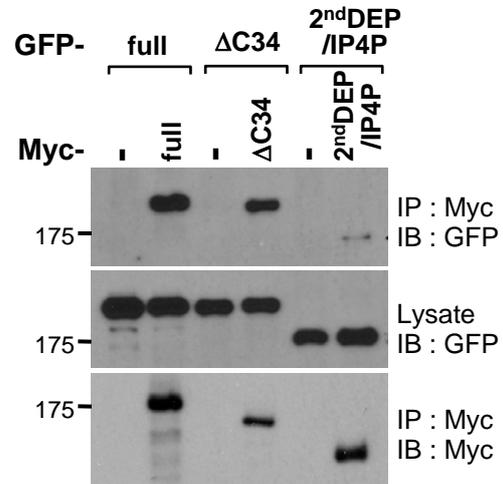
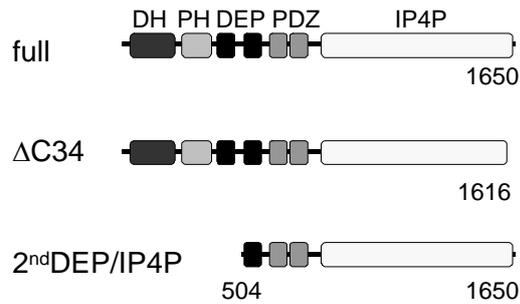
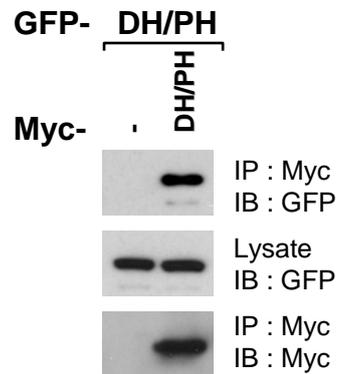
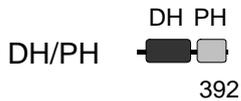
A**Myc- or GFP-P-Rex1****B****Myc- or GFP-P-Rex1**

図8 細胞内でのP-Rex1のホモ多量体形成

A.B) HEK293T細胞にMyc-P-Rex1並びにGFP-P-Rex1または変異体を図中に記載した通りに過剰発現させ、48時間後に細胞を回収してanti-Myc抗体による免疫沈降を行った。左側には細胞に導入したP-Rex1全長および変異体の模式図、アミノ酸配列の境界並びに実験結果の概要を示した。右側のウエスタンブロットでは細胞ライセート(Lysate)と免疫沈降物(IP:Myc)に含まれるP-Rex1全長および変異体を検出した。三回以上の独立した実験を行い、その全てにおいて同様の結果が得られた。

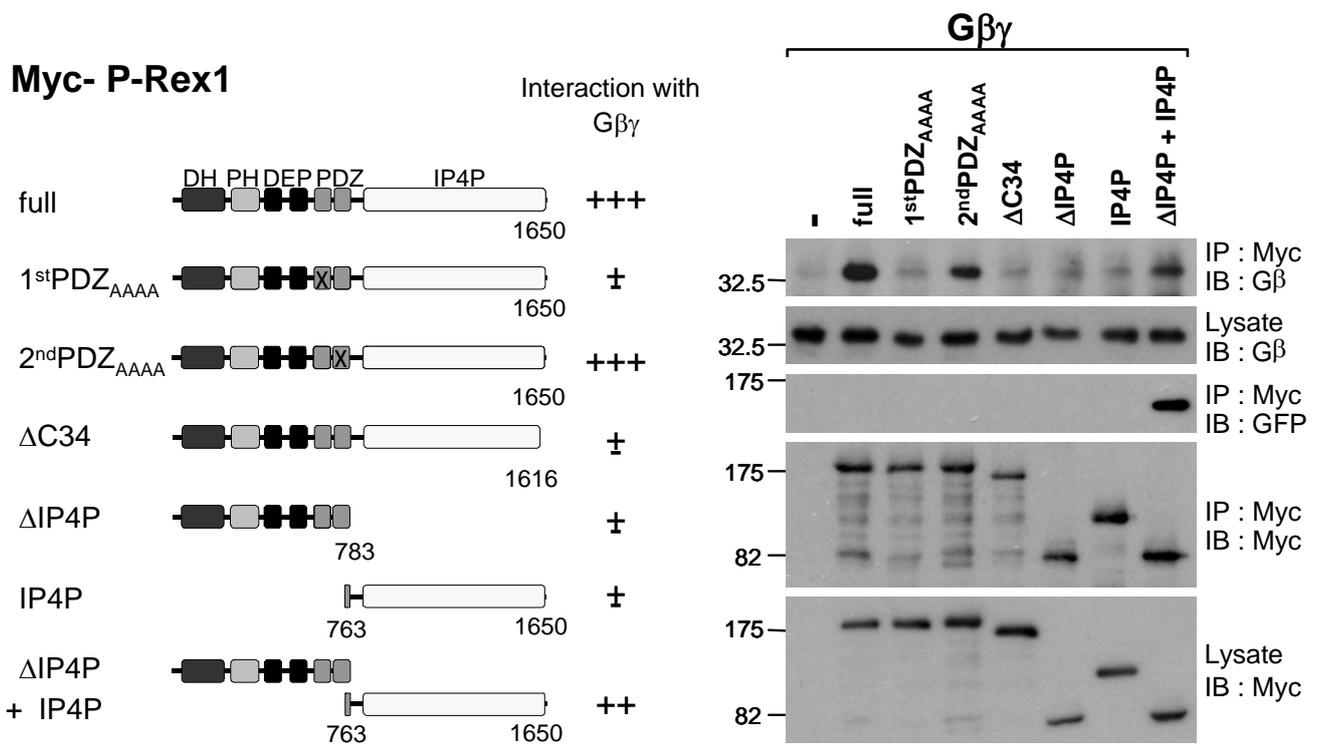


図9 $G\beta\gamma$ とP-Rex1の結合に及ぼすドメイン間相互作用の役割

HEK293T細胞に $G\beta_1\gamma_2$ とMyc-P-Rex1全長または変異体を図中に記載した通りに過剰発現させ、48時間後に細胞を回収してanti-Myc抗体による免疫沈降を行った。左側には細胞に導入したMyc-P-Rex1全長および変異体の模式図、アミノ酸配列の境界並びに実験結果の概要を示した。右側のウエスタンブロットでは細胞ライセート(Lysate)と免疫沈降物(IP:Myc)に含まれる $G\beta$ とMyc-P-Rex1全長及び変異体を示した。三回以上の独立した実験を行い、その全てにおいて同様の結果が得られた。

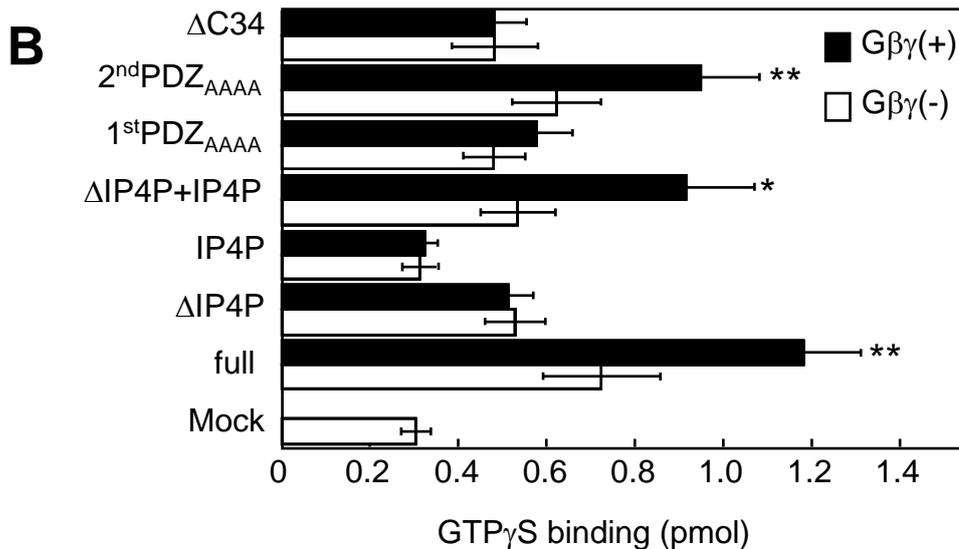
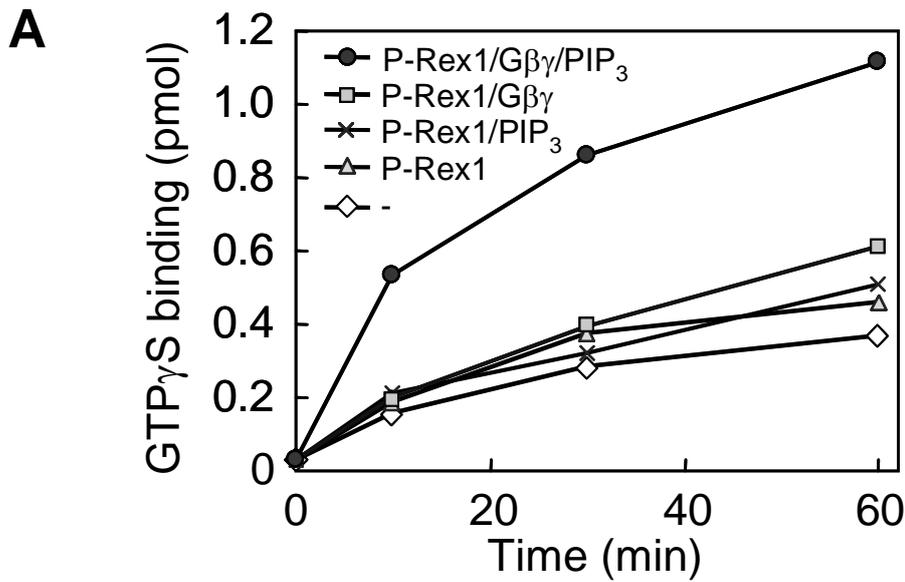


図10 P-Rex1のGEF活性に及ぼすP-Rex1のドメイン間相互作用の役割

- A) [³⁵S]GTPγS、His-Rac1、リポソームを含む反応液に表記の通りHis-P-Rex1、Gβ₁γ₂並びにPIP₃存在下で30°Cで10、30、60分間反応させニトロセルロース膜に通した。His-Rac1に結合した[³⁵S]GTPγSの量を液体シンチレーションカウンターで計測した。二回の独立した実験を行い代表的な結果を示した。
- B) [³⁵S]GTPγS、His-Rac1、リポソームを含む反応液にGβ₁γ₂及びHEK293T細胞に発現させ免疫沈降したMyc-P-Rex1または変異体を加え20°Cで30分間反応させた。Aと同様にHis-Rac1に結合した[³⁵S]GTPγSの量を算出した。四回の独立した実験を行いその平均をグラフに示した。*p<0.01, **p<0.001

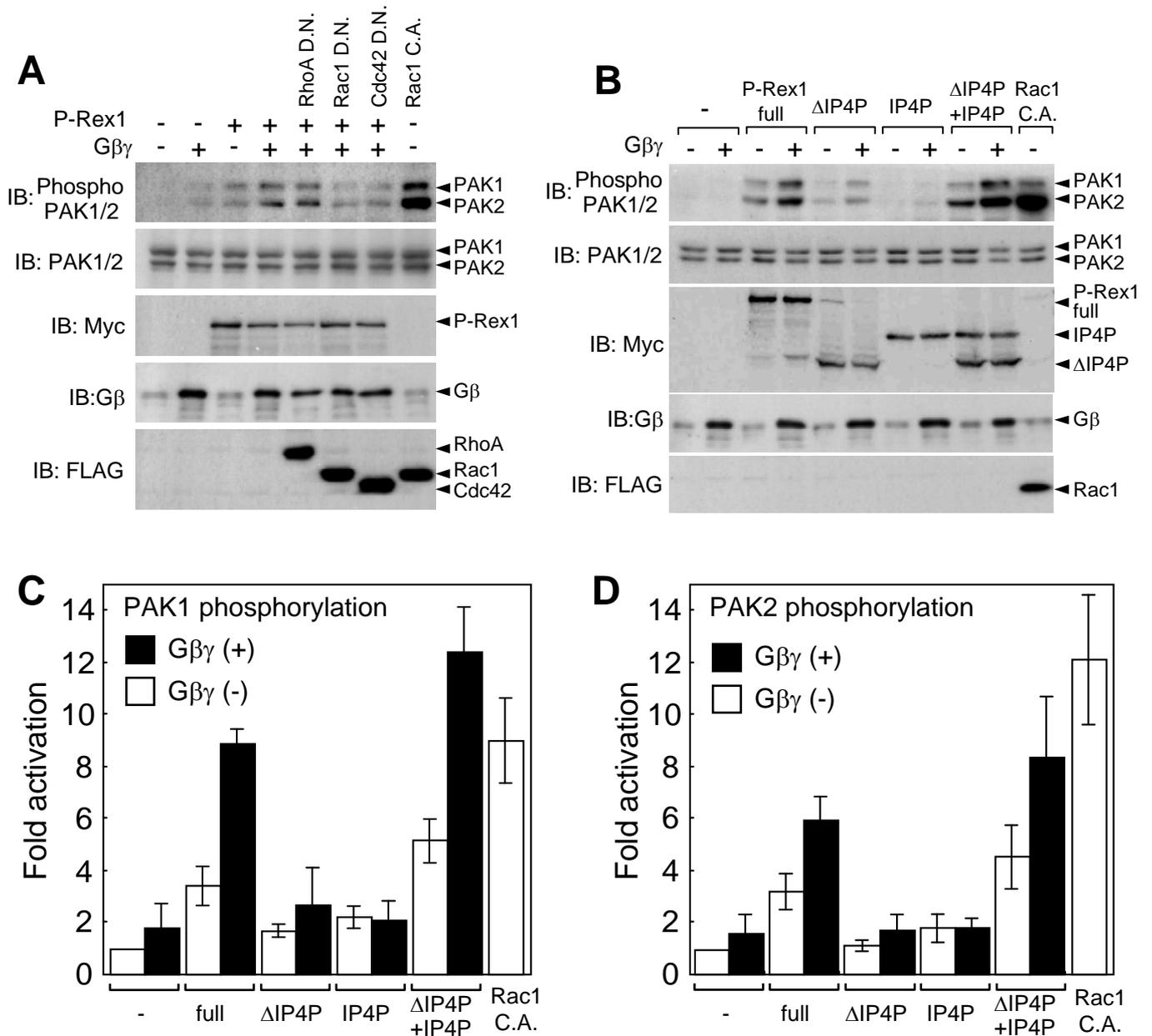


図11 PAKリン酸化に及ぼすP-Rex1のドメイン間相互作用の役割

A. B) HEK293T細胞にP-Rex1、Gβ₁γ₂及び各Rhoファミリーの恒常的活性型変異体(Rac1 C.A.)、不活性型変異体(RhoA D.N., Rac1 D.N., Cdc42 D.N.)を記載した通りに過剰発現させた。遺伝子導入の48時間後に細胞を回収してウェスタンブロットによりリン酸化PAK1/2と全PAK1/2及び過剰発現させたP-Rex1、Gβ並びにRhoA、Rac1、Cdc42の変異体を検出した。四回の独立した実験を行い全ての実験で同様の傾向がみられた。

C. D) Bのリン酸化PAK1とリン酸化PAK2のバンドの濃淡をNIH Imageを用いて数値化した。空ベクターのみを発現させたときのPAK1及びPAK2のリン酸化量を1として各条件の相対的なリン酸化量を算出した。グラフは四回の独立した実験の平均値を示した。

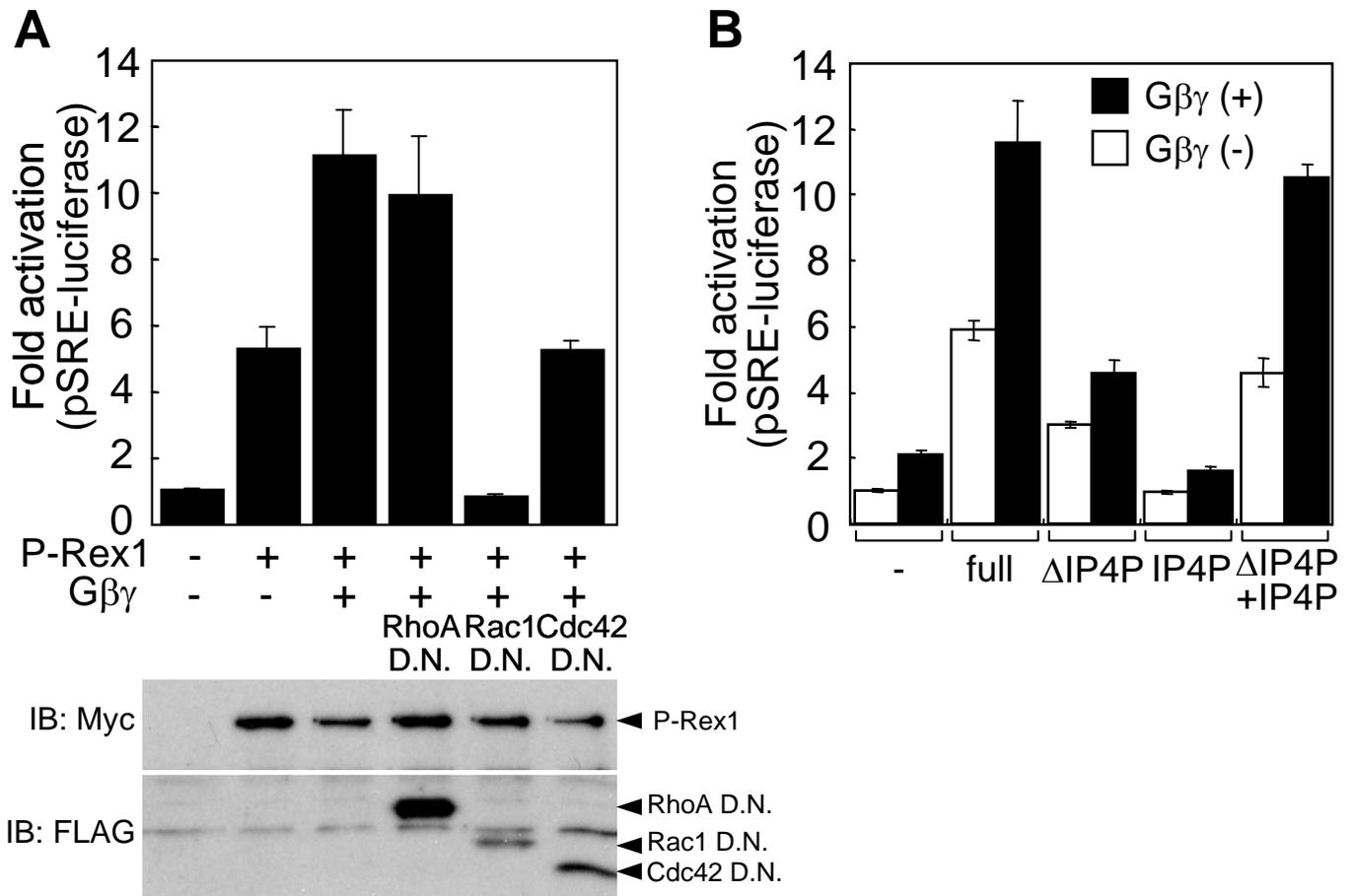


図12 SRE転写活性に及ぼすP-Rex1のドメイン間相互作用の役割

A. B) HEK293T細胞にP-Rex1、 $G\beta_1\gamma_2$ 及び各Rhoファミリーの不活性型変異体(RhoA D.N., Rac1 D.N., Cdc42 D.N.)を過剰発現させた。遺伝子導入の36時間後に細胞を回収してルシフェラーゼ活性を解析した。グラフは空ベクターを過剰発現させた際のルシフェラーゼの活性を1として各条件のルシフェラーゼ活性を相対的に示した。Aではウエスタンブロットにより過剰発現させたP-Rex1及びRhoA, Rac1, Cdc42の不活性型変異体の発現を確認した。

P-Rex1 + G $\beta\gamma$

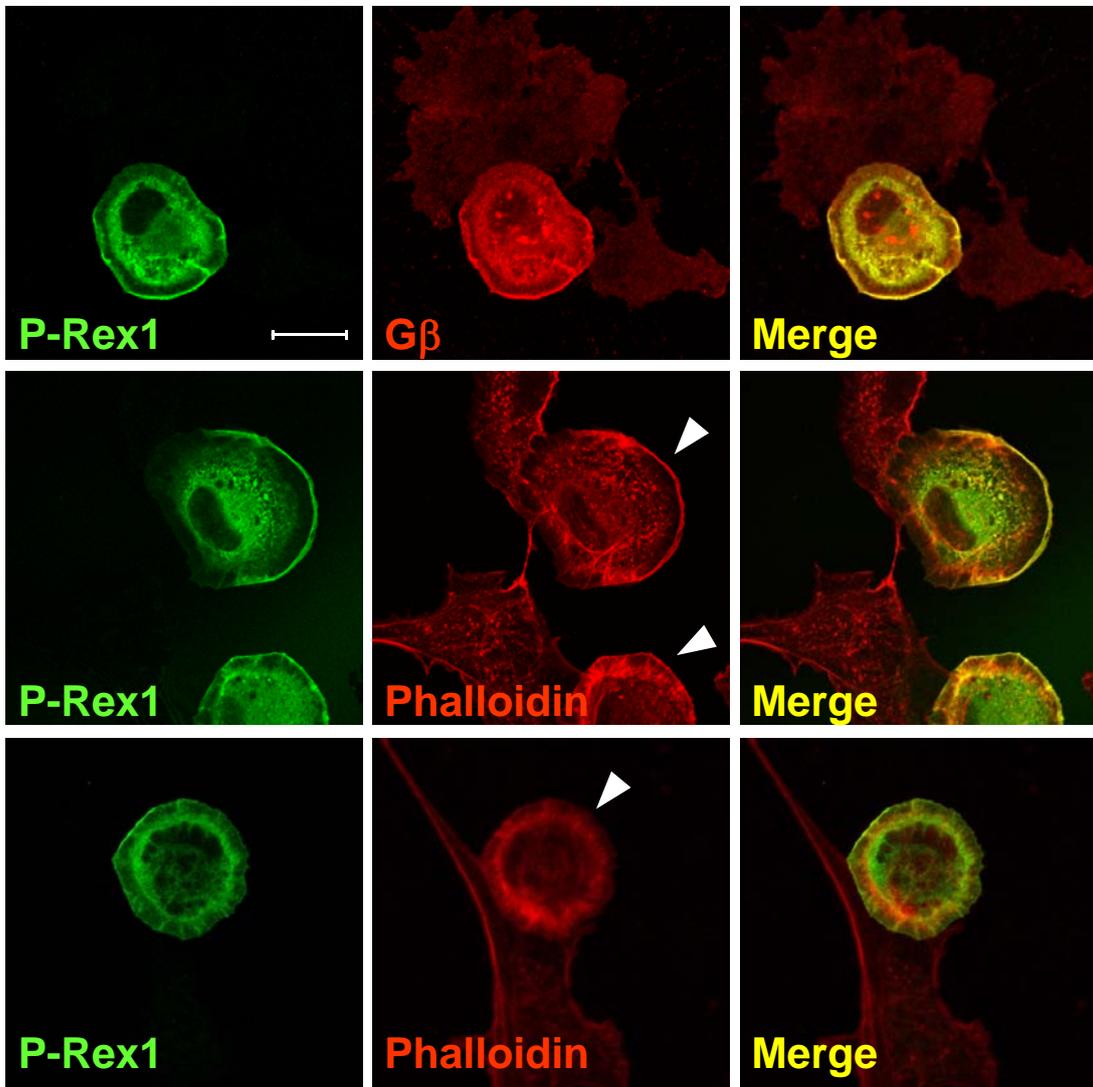


図13 P-Rex1とG $\beta\gamma$ によるラメリポディアの形成と細胞形態の変化

PDLコートしたグラスカバー上のNIH-3T3細胞にMyc-P-Rex1とG $\beta_1\gamma_2$ を過剰発現させ24時間後に細胞を固定し免疫染色を行った。P-Rex1(緑)とG β (赤)をanti-Myc抗体またはanti-G β 抗体を使用して染色し、アクチン繊維(赤)をPhalloidinを使用して染色した。矢頭は細胞辺縁部の円弧状に広がったラメリポディアを示す。Scale bar; 20 μ m

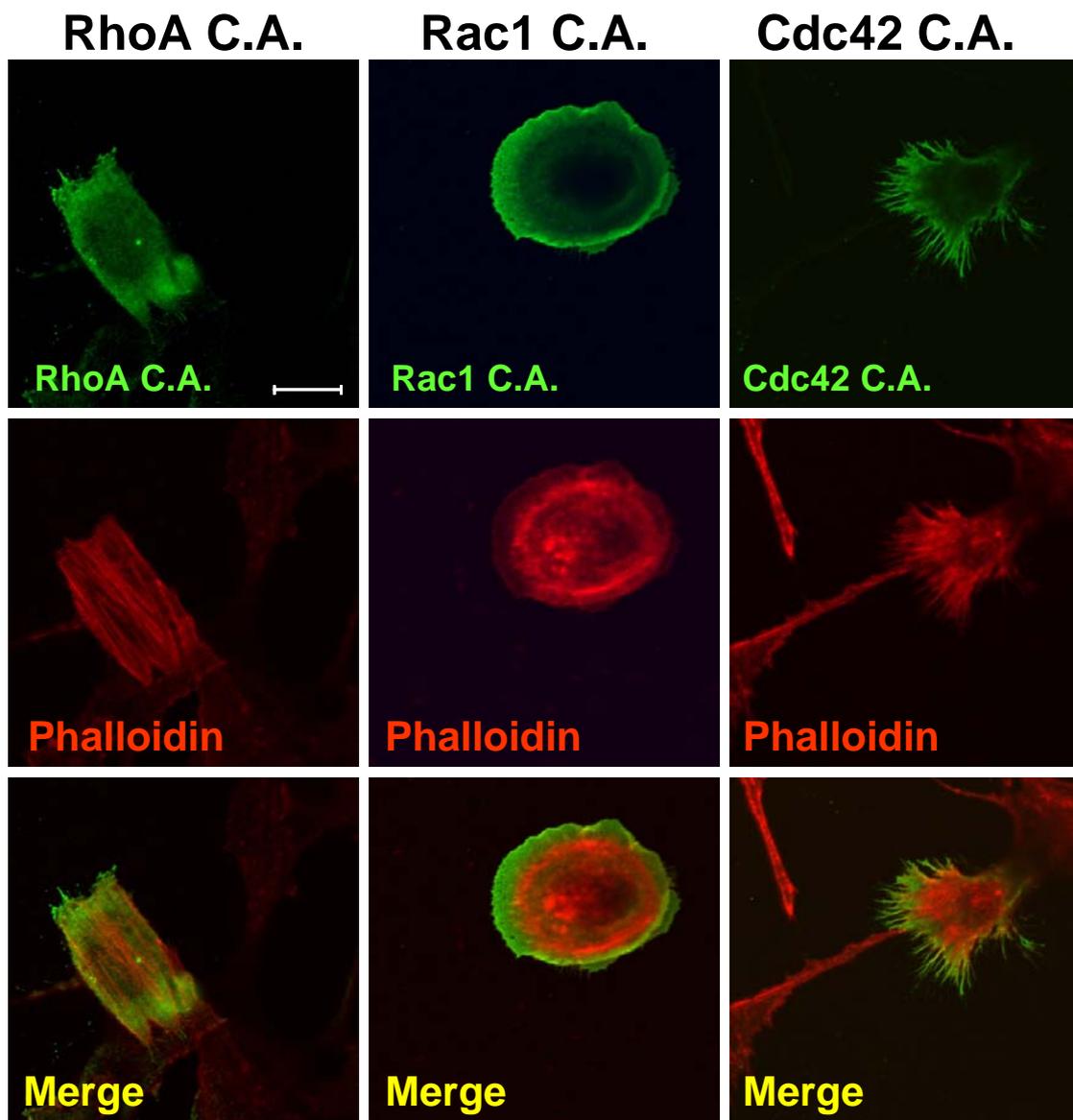


図14 RhoA, Rac1, Cdc42の恒常的活性型変異体の細胞形態に対する影響

PDLコートしたガラスカバー上のNIH-3T3細胞にFLAG-RhoA、Rac1並びにCdc42の恒常的活性型変異体(C.A.)を過剰発現させ36時間後に細胞を固定し免疫染色を行った。図13と同様の方法で24時間後に細胞を固定し、RhoA、Rac1、Cdc42(緑)をanti-FLAG抗体を使用し、アクチン繊維(赤)をPhalloidinを使用して染色した。Scale bar; 20 μ m

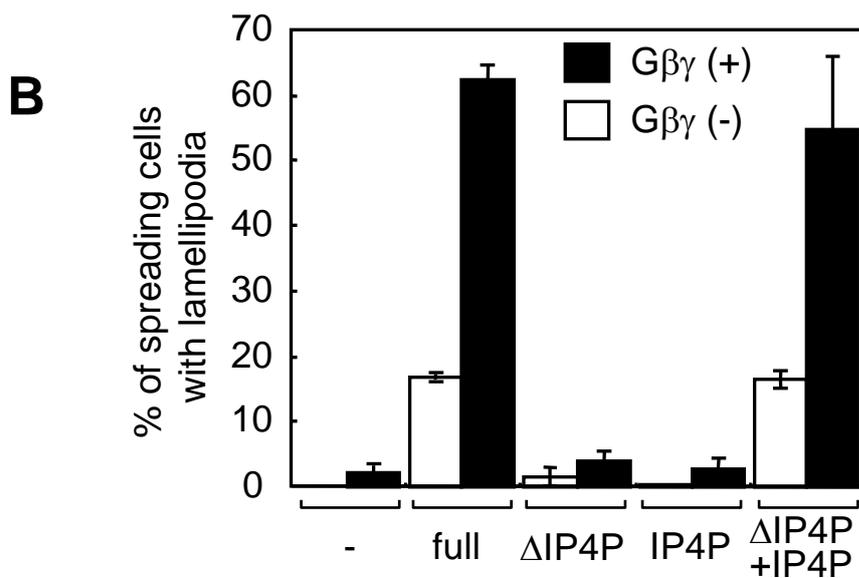
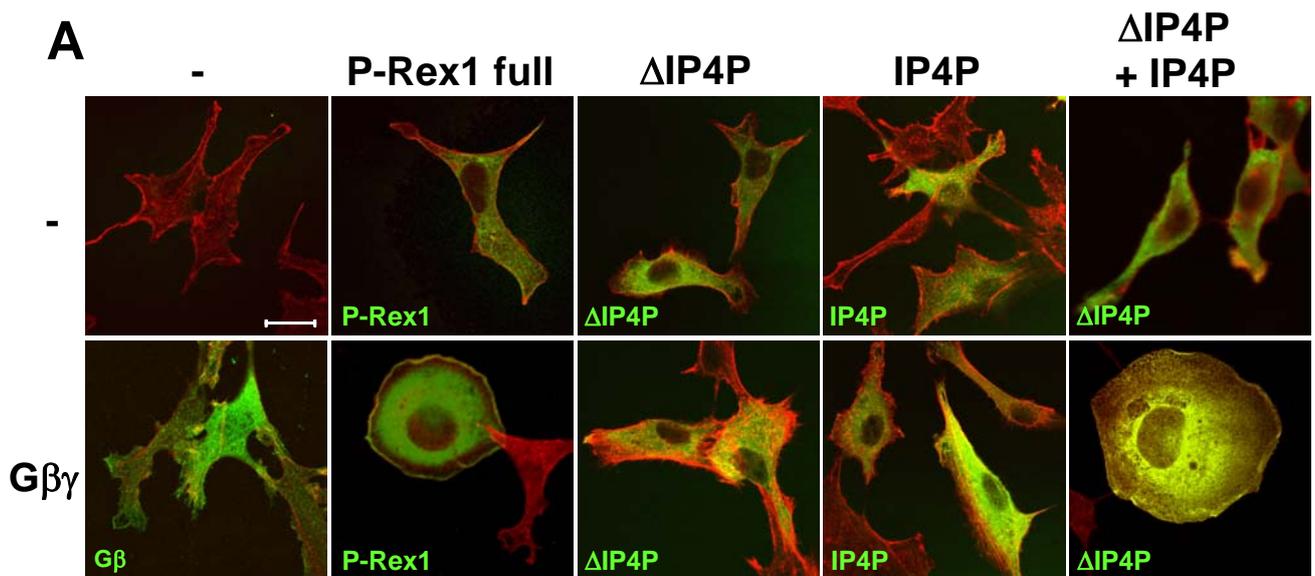


図15 ラメリポディアの形成に及ぼすP-Rex1のドメイン間相互作用の役割

A) PDLコートしたガラスカバー上のNIH-3T3細胞にP-Rex1とGβ₁γ₂を記載した通りに過剰発現させ24時間後に細胞を固定し免疫染色を行った。P-Rex1 (緑)又はGβ (緑)を各々に対する抗体を使用して染色し、アクチン繊維 (赤)をPhalloidinを使用して染色した。三回の独立した実験を行い、その全てにおいて同様の細胞形態の変化が観察された。

Scale bar; 20 μm

B) 各遺伝子が過剰発現した細胞のうち細胞辺縁部に広く円弧状にラメリポディアを有する細胞の割合を定量した。グラフは三回の独立した実験の平均を示した。

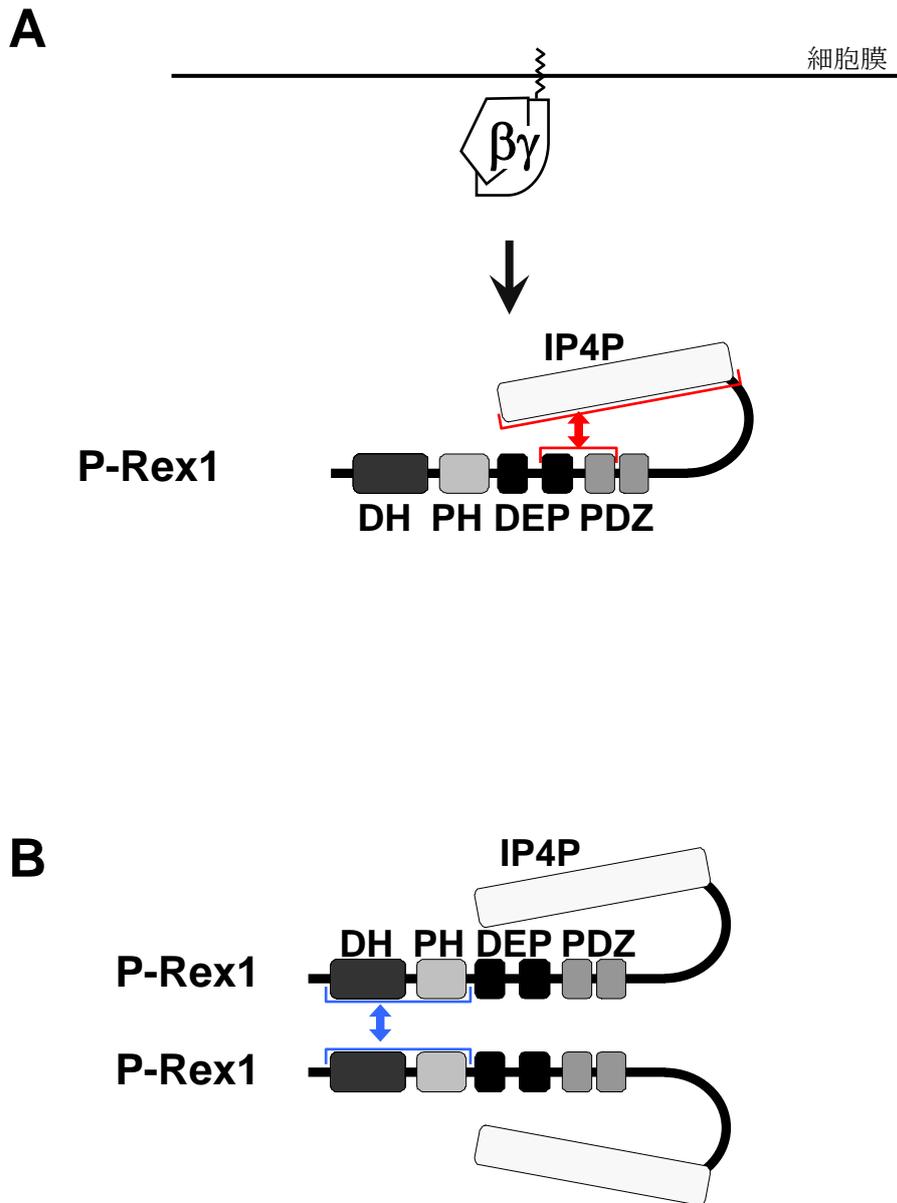


図16 P-Rex1のドメイン間相互作用と $G\beta\gamma$ による活性化のモデル図

- A) P-Rex1の2ndDEP/1stPDZドメインはIP4Pドメインと分子内で相互作用(赤)を形成しており、このドメイン間の相互作用が $G\beta\gamma$ との結合および活性化に必要である。
- B) P-Rex1はDH/PHドメインを介してホモ多量体(青)を形成する。このホモ多量体形成がP-Rex1の機能に関するかは、今のところ明らかではない。

第二章

Gs シグナルによる P-Rex1 抑制機構

<第二章 背景>

好中球において $G\alpha_s$ を介するシグナル伝達機構は $G\beta\gamma$ による活性酸素の産生に対して抑制的に機能する。 $G\alpha_s$ の下流では cAMP 濃度の上昇が起こり、PKA が活性化されて様々なタンパク質がリン酸化される。活性酸素の産生抑制への PKA の関与は、細胞を膜透過性の cAMP アナログに曝すと活性酸素の産生が顕著に阻害されることや、PKA の阻害剤を使った実験から確かめられている。PKA が活性酸素産生を抑制するメカニズムとして、PKA のシグナル伝達機構が PIP_3 の産生を抑制すること (Ahmed et al., 1995) や $p47^{phox}$ の膜移行に影響を与える可能性が報告されているが、PKA がリン酸化する標的分子を含め不明な点が多い。P-Rex1 は活性酸素の産生に必須の分子であり、*in vitro* において PKA により直接リン酸化され活性が低下することが報告された (Mayeenuddin and Garrison, 2006)。このような背景から、P-Rex1 の PKA によるリン酸化による抑制機構を解明することは、 $G\beta\gamma$ による P-Rex1 活性化に対する抑制機構の解明に留まらず、好中球による過剰な活性酸素産生を抑制する機構の解明へと繋がる可能性が期待できる。

P-Rex1 は *in vitro* において PKA により直接リン酸化される。リン酸化された P-Rex1 は P-Rex1 単独での GEF 活性が低下し、また $G\beta\gamma$ の感受性も低下する (Mayeenuddin and Garrison, 2006)。PKA による P-Rex1 のリン酸化部位や抑制の分子機構について報告はなく、PKA がどのように P-Rex1 の活性化を阻害しているのか明らかではない。リン酸化による P-Rex1 抑制の分子機構として、P-Rex1 と $G\beta\gamma$ の結合親和性の低下や P-Rex1 と Rac の結合親和性の低下に起因する可能性、あるいは分子間の結合親和性には影響しないが P-Rex1 による Rac の GDP/GTP 交換反応の促進機能が低下する可能性が考えられた。第二章では、P-Rex1 のリン酸化部位の同定並びに、P-Rex1 の抑制機構の解明を目指し解析を行った。

<第二章 結果>

2-1. *in vitro* における P-Rex1 のリン酸化と GEF 活性

Mayeenuddin L.H. and Garrison J.C. は *in vitro* において P-Rex1 が PKA によりリン酸化されることを報告した。この確認のため、P-Rex1 を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と 10 units/ μl PKA 存在下で 30°C でリン酸化させた。その結果、PKA 非存在下で反応を行った対照と比べ、PKA 存在下での P-Rex1 への ^{32}P 取り込み量は顕著に増加した(図 17A)。次いで、PKA によるリン酸化の時間依存性を検討したところ、90 分間の反応で ^{32}P の取り込み量が飽和した(図 17B)。続いて P-Rex1 の GEF 活性に対するリン酸化の影響を調べるために、P-Rex1 を PKA と ATP 存在下で 30°C で 2 時間反応させ、His-Rac1 への $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ の結合量を指標に GEF 活性を測定した。その結果、PKA を加えずに同様の反応を行った対照では、 $\text{G}\beta_1\gamma_2$ と PIP_3 存在下で顕著な GEF 活性が確認されたが、PKA でリン酸化を行った P-Rex1 では $\text{G}\beta_1\gamma_2$ と PIP_3 を加えた条件においても His-Rac1 への $\text{GTP}\gamma\text{S}$ の結合を促進しなかった(図 17C)。P-Rex1 の GEF 活性が低下した一つの理由として P-Rex1 と $\text{G}\beta\gamma$ の結合親和性の低下が考えられた。そこで、表面プラズモン共鳴を利用して $\text{G}\beta_1\gamma_2$ と P-Rex1 の結合親和性に対するリン酸化の影響を検討した。その結果、P-Rex1 をリン酸化すると、リン酸化していない対照と比べ、 $\text{G}\beta\gamma$ 固定化チップとの結合量が顕著に低下した(図 17D)。これらの結果から、P-Rex1 の GEF 活性は PKA によるリン酸化で顕著に低下し、この GEF 活性の低下は P-Rex1 と $\text{G}\beta\gamma$ との結合親和性の低下に起因する可能性が示唆された。

2-2. 細胞内における PKA による P-Rex1 の機能修飾

in vitro において、リン酸化された P-Rex1 は $\text{G}\beta\gamma$ との結合親和性が低下したため、細胞内における P-Rex1 と $\text{G}\beta\gamma$ との相互作用並びに P-Rex1 のドメイン間相互作用に PKA が影響を与える可能性が考えられた。そこで、Myc-P-Rex1、 $\text{G}\beta\gamma$ と PKA の触媒サブユニット (FLAG-PKA-C α) を HEK293T 細胞に共発現させ anti-Myc 抗体による免疫沈降を行った。その結果、PKA-C α を共発現させると、 $\text{G}\beta$ は Myc-P-Rex1 とほとんど共沈降しなくなった(図 18A)。次に、P-Rex1 のドメイン間相互作用に PKA によるリン酸化に係る可能性を検討した。HEK293T 細胞に Myc- ΔIP4P と GFP-IP4P と FLAG-PKA-C α を共発現させ免疫沈降を行った。その結果、Myc- ΔIP4P と共沈降する GFP-IP4P の量が FLAG-PKA-C α の共発現により減少した(図 18B)。次に、P-Rex1 と $\text{G}\beta\gamma$ により引き起こされる細胞周縁部でのラメリポディアの形成

を伴った細胞形態の変化に対する PKA シグナルの影響を解析した。その結果、PKA-C α を過剰発現した条件、あるいはアデニル酸シクラーゼの活性化剤である forskolin と cAMP ホスホジエステラーゼの阻害剤である IBMX を同時に処理した条件では、長く円弧状に広がったラメリポディアの形成が阻害された (図 18C)。これらの結果から、P-Rex1 の活性は細胞内においても PKA のシグナルにより阻害されること、PKA はドメイン間相互作用に影響を与えることで P-Rex1 と G $\beta\gamma$ との結合親和性を低下させることが示唆された。

2-3. P-Rex1 のリン酸化部位

図 17 と図 18 から、P-Rex1 を PKA でリン酸化すると GEF 活性が低下すること、G $\beta\gamma$ との結合親和性が低下すること、さらにドメイン間相互作用が減弱することが示された。リン酸化による P-Rex1 の抑制機構を解明するために、P-Rex1 のリン酸化部位の解析を行った。His-P-Rex1 を PKA と ATP 存在下で 2 時間リン酸化し、SDS-PAGE によりタンパク質を分離後、ゲル内トリプシン消化し P-Rex1 のペプチド断片を得た。P-Rex1 のペプチド断片を LC-MS/MS に供し、検出されたシグナルの質量電荷比を Mascot software を使用し P-Rex1 の一次構造から予想されるトリプシン消化ペプチドの質量電荷比と照合した結果、5 種類の P-Rex1 のリン酸化ペプチドが同定された (図 19)。650 番目のセリン残基を含むリン酸化ペプチドは、649 番目のグリシンから 669 番目のアルギニンまでを含むペプチド断片 (GpSLAEMAGLQAGR)に加え、トリプシンの部分消化ペプチドと考えられる 645 番目のセリンから 669 番目のアルギニンまでを含むペプチド断片 (SVQRGpSLAEMAGLQAGR)が検出された。それぞれのリン酸化ペプチドの MS/MS スペクトル解析を行った結果、314 番目のセリン残基、431 番目のセリン残基、650 番目のセリン残基がリン酸化されることを確かめた (図 20)。314 番目のセリン残基は PH ドメインの β 3/ β 4 ループに (図 21)、431 番目のセリン残基は 1stDEP ドメインに (図 23)、650 番目のセリン残基は 1stPDZ ドメインに (図 24) 位置していた。また、各生物種の P-Rex1 のアミノ酸配列比較を行った結果、3 箇所 of リン酸化部位は広く生物種間で保存されていた。

2-4. P-Rex1 の 314 番目のセリン残基のリン酸化

314 番目のセリン残基は P-Rex1 の PH ドメインの β 3/ β 4 ループに存在する。Joseph R.E. and Norris F.A.は、P-Rex2 の β 3/ β 4 ループは Rac との結合に必須の部位であることを報告した (Joseph and Norris, 2005)。また、Rossmann K.L.らは Dbs の DH

及び PH ドメインと Cdc42 との複合体の結晶構造および機能解析を行い、Dbs の PH ドメインの $\beta 3/\beta 4$ ループが Cdc42 との結合部位であること、また Dbs の PH ドメインが Dbs の GEF 活性を十分に引き出すために必要であることを示した(Rossman et al., 2002)。そこで、P-Rex1 の 314 番目のセリン残基のリン酸化が P-Rex1 と Rac の結合、および Rac に対する GEF 活性に及ぼす効果を調べるために、P-Rex1 の恒常的活性型変異体である P-Rex1-DH/PH、DH/PH-S314A および DH/PH-S314E 変異体の組換えタンパク質を作製した。P-Rex1 の野生型は Rac と Cdc42 に対して GEF 活性を有する。まず、P-Rex1-DH/PH が野生型と同様の基質特異性を有するか検討する為に、*in vitro* における RhoA、Rac1、Cdc42 に対する GEF 活性の測定と、P-Rex1-DH/PH と RhoA、Rac1、Cdc42 の結合実験を行った。GTP の非分解性アナログに蛍光標識した MANT-GMPPNP (MANT) が RhoA、Rac1、Cdc42 へ結合すると蛍光強度が増強することを指標に P-Rex1 の GEF 活性を評価した。その結果、P-Rex1 の DH/PH は Rac1、Cdc42 への MANT の結合を促進したが、RhoA への MANT の結合には全く影響を与えなかった (図 22A)。次に *in vitro* における結合実験を行った結果、P-Rex1-DH/PH は Rac1 と最も強く、Cdc42 と次に強く結合し、RhoA とも若干結合することが明らかとなった (図 22B)。

次に P-Rex1-DH/PH と DH/PH-S314A、DH/PH-S314E を用いて結合実験を行い、314 番目のセリン残基が RhoA、Rac1、Cdc42 との結合に及ぼす役割を検討した。その結果、P-Rex1-DH/PH と比べ DH/PH-S314E では Rac1 との結合が若干弱まった (図 22C)。これらの結果は、314 番目のセリンのリン酸化が P-Rex1 と Rac1 との結合を妨げる可能性を示唆している。

2-5. P-Rex1 の 650 番目のセリン残基のリン酸化

650 番目のセリン残基は P-Rex1 のドメイン間相互作用に係る 1stPDZ ドメインに在る。また、HEK293T 細胞に PKA-C α を過剰発現させると P-Rex1 のドメイン間相互作用が弱まることが示された (図 18B)。これらの結果から、P-Rex1 の 650 番目のセリン残基のリン酸化が P-Rex1 のドメイン間相互作用および P-Rex1 と G $\beta\gamma$ との相互作用を阻害する可能性が考えられた。そこで、P-Rex1 の各リン酸化部位をアラニンに置換した非リン酸化型変異体(P-Rex1-S650A、 Δ IP4P-S650A)、グルタミン酸に置換した偽リン酸化型変異体(P-Rex1-S314E, S431E, S650E, TripleE (S314E/S431E/S650E), Δ IP4P-S650E)を作製した。まず、HEK293T 細胞に Myc-P-Rex1 full、S314E、S431E、S650E あるいは TripleE を過剰発現させ anti-Myc 抗体による免疫沈降を行い G $\beta\gamma$ の共沈降量を解析した。その結果、G $\beta\gamma$ は P-Rex1 full、P-Rex1-S314E、P-Rex1-S431E のいずれとも同程度に共沈降した (図 25A, lanes 2, 3

and 4)。これらと比較して、P-Rex1-S650E、P-Rex1-TripleE を免疫沈降したときには共沈降する Gβγ の量が著しく減少した (図 25A, lanes 5 and 6)。続いて、Myc-P-Rex1 full、S650A を PKA-Cα と共に HEK293T 細胞に過剰発現させ anti-yc 抗体により免疫沈降を行った結果、Gβγ は P-Rex1 full や S650A と共沈降したが、P-Rex1 full または S650A と PKA-Cα を共発現させると共沈降する Gβγ の量が減少した(未掲載データ)。これらの結果は、P-Rex1 の 650 番目のセリン残基のリン酸化が Gβγ と P-Rex1 の相互作用を弱めること、PKA は 650 番目のセリン残基だけでなく、他の場所もリン酸化して P-Rex1 と Gβγ との相互作用を弱めることを示唆している。

第一章で明らかにした通り、P-Rex1 と Gβγ との相互作用には、P-Rex1 のドメイン間相互作用が必要である。そこで 650 番目のセリン残基のリン酸化が P-Rex1 のドメイン間相互作用に与える影響を検討するために、HEK293T 細胞に Myc-ΔIP4P、ΔIP4P-S650A または ΔIP4P-S650E と GFP-IP4P を過剰発現させ、anti-Myc 抗体による免疫沈降を行った。その結果、GFP-IP4P は Myc-ΔIP4P と共沈降したが、ΔIP4P-S650A とは共沈降したがその量が減少し、ΔIP4P-S650E とは全く共沈降しなかった (図 25B)。また、PKA 認識配列である 648 番目のアルギニンをアラニンに置換した Myc-ΔIP4P-R648A 変異体を用い免疫沈降を行った結果、ΔIP4P-S650A と同様に、共沈降する GFP-IP4P の量が Myc-ΔIP4P と比べ減少した(未掲載データ)。この結果から、P-Rex1 の 650 番目のセリン残基のリン酸化が P-Rex1 のドメイン間相互作用を減弱させることで、P-Rex1 と Gβγ との相互作用を阻害する可能性が示唆された。

650 番目のセリン残基が PKA によりリン酸化されることを確かめるために、*in vitro* における P-Rex1、S650A および S650E 変異体の PKA によるリン酸化を解析した。[γ-³²P]ATP と PKA 存在下でリン酸化反応を行い、P-Rex1 組換えタンパク質への ³²P の取り込み量を指標にリン酸化を検討した結果、P-Rex1 と比較して S650A および S650E 変異体では ³²P の取り込み量が減少した (図 25C)。次に質量分析法を利用して 650 番目のセリン残基の PKA 依存的なリン酸化を確認した。P-Rex1 を PKA 存在下、非存在下でリン酸化し、そのトリプシン消化ペプチドを解析した。その結果、PKA を加えた条件においてのみ 650 番目のセリンを含むペプチドにリン酸基が一つ加わった質量電荷比に対応するピークが検出された (図 25D)。これらの結果から、*in vitro* において P-Rex1 の 650 番目のセリン残基が PKA によりリン酸化されることが明確に示された。

2-6. 好中球の活性酸素産生に対する Gs シグナルの役割

好中球は fMLP 等の細胞外リガンド刺激により活性酸素を生成し食胞内や細胞

外へと放出する。この活性酸素の産生に対して PKA を活性化する薬剤(forskolin や dbcAMP)および細胞外リガンド(isoproterenol や PGE₂ など)は抑制的に機能する。まずこれらの知見の確認のため、1.3% DMSO 処理により好中球様に分化させた HL-60 細胞 (differentiated HL-60 細胞、dHL-60 細胞) を用いて、fMLP による活性酸素の産生および各種薬剤の影響を検討した。その結果、1 μM fMLP による活性酸素の産生は 1 μM PGE₂、1 μM isoproterenol、200 μM dbcAMP および 1 μM forskolin/0.1 mM IBMX 処理により顕著に抑制された (図 26A, 26B, 26C)。また isoproterenol 刺激により dHL-60 細胞において cAMP が産生されることを確かめた (図 26D)。次に、この抑制経路に対する PKA の関与を、PKA 阻害剤(1 μg/ml KT-5720)を使用して確かめた。その結果 1 μM PGE₂ による抑制効果は、KT-5720 処理により部分的に解除された (図 27B)。また、fMLP 刺激による活性酸素産生の素早い終息もまた、PKA を介するシグナル伝達機構が関与する可能性(Mitsuyama et al., 1995)が知られているが、相反する研究成果もありコンセンサスが得られていない。そこで 2 種類の PKA の阻害剤(1 μg/ml KT5720, 1 μM ないし 10 μM H-89)を使用して、fMLP 刺激および対照として Gq 共役受容体のアゴニストである UTP 刺激による活性酸素産生に対する効果を検討した。その結果、PKA 阻害剤の処理により、fMLP 刺激による活性酸素産生量を増大させたが、UTP 刺激による活性酸素の産生に対しては影響を与えなかった(図 27A, 27C)。これらの結果から、様々な PKA 活性化シグナルが活性酸素の産生に抑制的に機能することに加え、fMLP が活性酸素を産生させるシグナルを伝えると同時に、PKA のシグナルを活性化して活性酸素の産生を抑制する可能性が示唆される。また dHL-60 細胞には P-Rex1 が発現していることを、anti-P-Rex1 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した (図 27D)。

<第二章 考察>

第二章では、PKA による P-Rex1 の活性調節機構の解明を目指し解析を行った。その結果、(1)PKA によるリン酸化が P-Rex1 の IP4P ドメインと 2ndDEP/1stPDZ ドメインのドメイン間相互作用を阻害すること、(2)リン酸化が P-Rex1 と Gβγとの結合、および Gβγによる P-Rex1 の活性化を阻害すること、(3)P-Rex1 のリン酸化部位は少なくとも3箇所存在すること、(4)314番目のセリン残基のリン酸化は P-Rex1 と Rac1 との結合親和性を低下させること、(5)650番目のセリン残基のリン酸化は P-Rex1 と Gβγの相互作用および P-Rex1 のドメイン間相互作用を阻害することが示唆された。更に、G_s および PKA シグナルによる活性酸素の産生抑制の統括的な理解を深め、(1)G_s シグナルが、fMLP 刺激による活性酸素産生に対して抑制的に働くことを確かめ、(2)fMLP は活性酸素を産生するシグナルを流すと同時に、PKA シグナルを作動して活性酸素の産生を抑制するシグナルを伝達する可能性を示唆した。

図 17 では、PKA は *in vitro* において P-Rex1 をリン酸化すること、リン酸化された P-Rex1 は His-Rac1 の GDP/GTP 交換反応を促進しないことを示した。このことから、リン酸化が P-Rex1 と Gβγ、PIP₃ ないしは Rac1 の結合親和性を低下させる可能性や、分子間の結合親和性には影響を及ぼさないが P-Rex1 が持つ GEF 活性に障害を起こす可能性などが考えられた。

同定したリン酸化部位のうち、650番目のセリン残基はドメイン間相互作用に関係する 1stPDZ ドメインに存在する。図 18B では PKA 触媒サブユニット(PKA-Cα)の共発現により細胞内での P-Rex1 のドメイン間相互作用が阻害されることを示した。また図 25B では、650番目のセリンの擬似リン酸化型変異体(ΔIP4P-S650E)では細胞内での IP4P ドメインとの相互作用が完全に阻害され、非リン酸化型変異体(ΔIP4P-S650A)でも相互作用が弱まることを示した。これらの結果は、P-Rex1 のドメイン間相互作用における 650番目のセリン残基の重要性を示しており、このセリン残基が IP4P ドメインと相互作用に係ることが想像される。図 18A、図 25A では PKA 触媒サブユニット(PKA-Cα)の共発現や 650番目のセリンの擬似リン酸化(S650E)が P-Rex1 と Gβγとの相互作用を阻害する結果を示しており、P-Rex1 の 650番目のセリン残基のリン酸化により P-Rex1 のドメイン間相互作用が阻害されるため Gβγと結合親和性が低下するという抑制モデルが考えられる(図 28B)。また、P-Rex1 の 650番目のセリンの非リン酸化型変異体(P-Rex1-S650A)は Gβγとの相互作用が確認されたが、P-Rex1 full と同様に PKA の過剰発現により Gβγとの相互作用が弱まった。このため、650番目のセリン以外のリン酸化部

位もまた、P-Rex1 と Gβγとの相互作用に係る可能性が考えられる。いずれにしても、650番目のセリン残基が PKA によりリン酸化されること、および 650番目のセリン残基が P-Rex1 のドメイン間相互作用および P-Rex1 と Gβγとの相互作用に非常に重要であることが明らかとなった。

P-Rex1 の 1stPDZ ドメインのアミノ酸配列を、結晶構造が解かれた PDZ ドメインの配列と比較すると、P-Rex1 の 650番目のセリン残基は 1stPDZ ドメインのβ3シートとα1ヘリックスの間のループ構造に在り、分子表面に曝されていることが分かる (図 24A)。第一章では、1stPDZ ドメインの 4 残基(Gly-Tyr-Gly-Phe, 629-632 aa)をアラニンに置換するとドメイン間相互作用が起こらなくなることを示した。650番目のセリンはこれら 4 残基と近接しているが、PDZ ドメインの C 末端配列結合領域とは異なる分子表面に位置する。一般にタンパク質間の相互作用は、広い分子表面で形成される原子間の相互作用の総和として起こると考えられ、1stPDZ ドメインと IP4P ドメインとの相互作用は、1stPDZ ドメインの既知の C 末端配列結合部位だけでなく、650番目のセリン残基近傍の分子表面も重要な役割を担う可能性が考えられる。1stPDZ ドメインと IP4P ドメインとの結合様式は、P-Rex1 の結晶構造解析など更なる解析から明らかとなると考えられる。

PH ドメインのβ3/β4 ループに位置する 314 番目の擬似リン酸化型変異 (S314E)は、P-Rex1-DH/PH と Rac1 との結合を若干弱めた (図 23C)。Joseph R.E and Norris F.A.は、P-Rex2 の PH ドメインからβ3/β4 ループを欠損させると Rac と結合できないようになることを示し、β3/β4 ループが Rac との結合に係ることを明らかにした(Joseph and Norris, 2005)。また、Rossmann K.L.らは結晶構造解析から、Rho ファミリー-GEF である Dbs のβ3/β4 ループが基質である Cdc42 との結合に係ることを示した (図 21A)。これらの情報からも P-Rex1 の 314 番目のセリン残基のリン酸化が Rac との結合に何らかの影響を与えるモデルが考えられる(図 28B)。今後 P-Rex1-DH/PH、DH/PH-S314E を利用して Rac-GEF 活性を測定することで、314 番目のセリン残基のリン酸化の機能面での重要性が明らかにしたいと考えている。

P-Rex1-TripleA(S314A/S431A/S650A)変異体の組換えタンパク質を作成し、*in vitro* におけるリン酸化反応を行った結果、TripleA 変異体においても PKA によって若干リン酸化されることが示された(未掲載データ)。このことから、同定した 3 箇所のリン酸化部位の他にもリン酸化される残基が存在すると考えられた。一般にキナーゼによるリン酸化部位は、1 箇所のリン酸化残基の近傍に他のリン酸化残基が存在し、クラスターを形成している場合が多い。P-Rex1 の 3 箇所のリン酸化部位近傍のアミノ酸配列を調べると、図 21B に示した通り、314 番目のセリン残基の N 末端側に PKA によるリン酸化コンセンサス配列がクラスターを形成している。第二章では P-Rex1 のトリプシン消化ペプチドを質量分析により解析しリン酸化部位の同定した。トリプシンはアルギニン、リシンの C 末端側のペプチド結合を切断する酵素である。PKA によるリン酸化のコン

センサス認識配列はリン酸化されるセリン/スレオニン残基の 2 残基ないしは 3 残基手前にアルギニン/リシン残基が存在する。そのため、トリプシン消化を行うと PKA でリン酸化されるセリン/スレオニンの直ぐ N 末端側で切断を受ける。従って PKA によるリン酸化残基がクラスターを形成する場合、その部分のトリプシン消化ペプチドは大変短くなり、質量分析装置では検出できない可能性が高い。実際、本研究においては 314 番目のセリン残基の N 末端側のリン酸化クラスターに対応するペプチド断片は、リン酸化の有無に係らず検出できなかった。この部位の PKA によるリン酸化を調べるためには、V8 プロテアーゼなど他の酵素で消化したペプチドを質量分析法を用いて解析すべきと考えられる。

PH ドメインの $\beta 3/\beta 4$ ループは Rho、Rac、Cdc42 との結合部位としてだけでなく、イノシトールリン脂質との結合部位としても知られている。イノシトールリン脂質との結合にはアルギニンやリシンなど正に荷電した残基に係る。PH ドメインの $\beta 3/\beta 4$ ループのリン酸化により周辺の電荷が大きく負に変化することで、イノシトールリン脂質との結合に影響を与える可能性が考えられる。今後の課題として、 $\beta 3/\beta 4$ ループのリン酸化が PIP_3 との結合に影響を及ぼすか解析を行う必要があると考えている。

図 27 で、二種類の PKA に対する阻害剤が、fMLP 刺激による活性酸素の生成を促進したことから、fMLP は $G\beta\gamma$ のシグナル伝達経路を使用して活性酸素の産生を促すと共に、PKA のシグナル伝達経路を使用して素早く、活性酸素の産生を終息させる機構を備えていると考えられる。fMLP 受容体の下では $G\alpha_i$ と $G\beta\gamma$ がシグナル伝達を担うと考えられるが、 $G\beta\gamma$ はアデニル酸シクラーゼのタイプ II、IV、VII を活性化して細胞内の cAMP 濃度を上昇させることが知られている。好中球においても fMLP が細胞内 cAMP 産生を亢進することが報告されており (Mahadeo et al., 2007)、今後 fMLP が PKA シグナル介して活性酸素に対し抑制的なシグナルを伝達する機構を解析していきたい。また、図 24 では、細胞内で PKA を活性化させるような様々な細胞外リガンドや薬剤により、活性酸素の産生が抑制されることを示した。dHL-60 細胞には P-Rex1 が発現しており、この PKA シグナルによる活性酸素産生の抑制に P-Rex1 のリン酸化がどのように係るか、解析を進めていきたい。

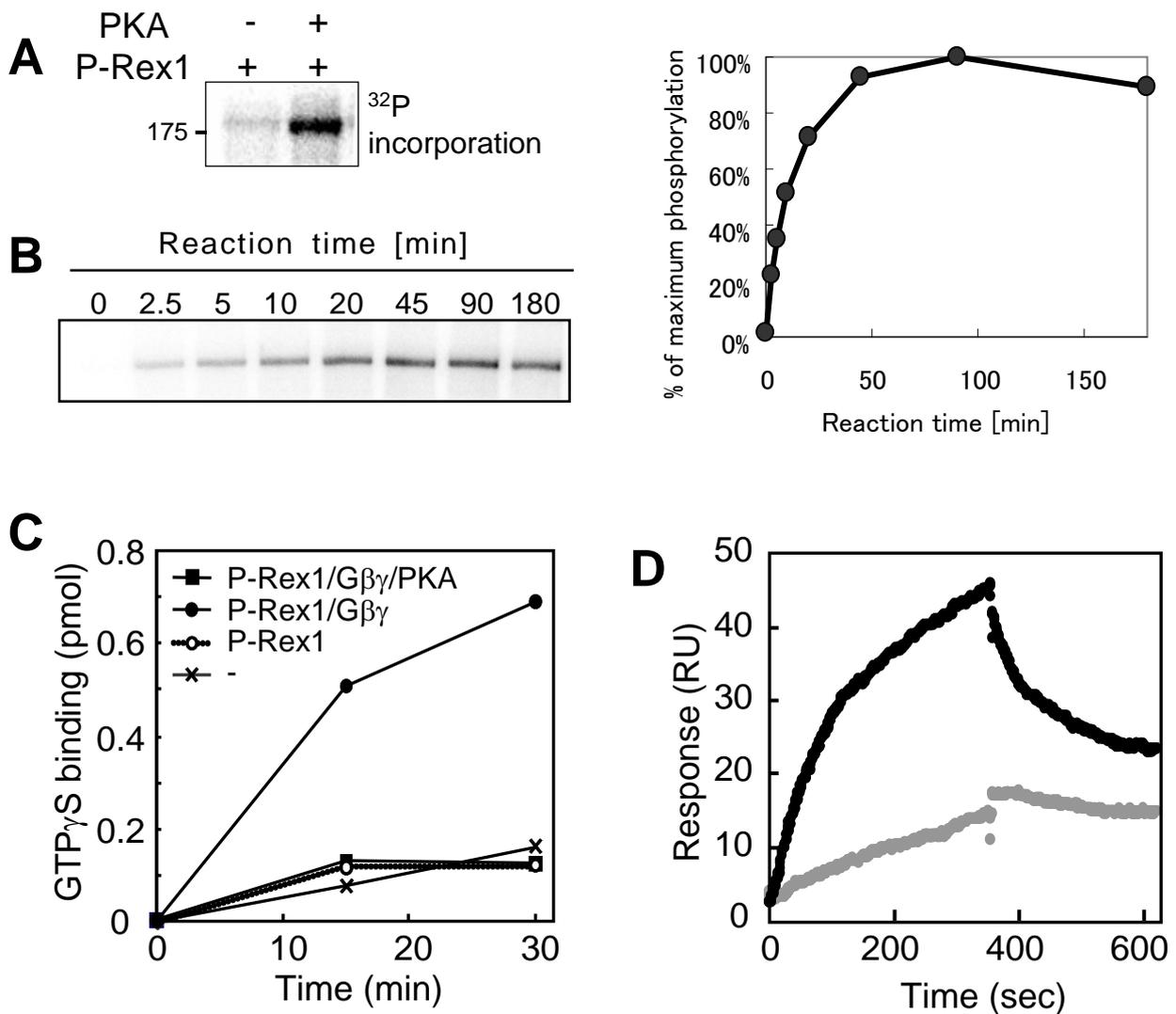


図17 *In vitro*におけるP-Rex1のリン酸化とGEF活性

A,B) P-Rex1をPKAと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下で 30°C で2時間(A)、あるいは表記の時間(B)リン酸化させた後SDS-PAGEにてタンパク質を分離した。P-Rex1への ^{32}P の取り込みはイメージングプレートに露光させ解析した。Bの定量結果をグラフに示した。

C) *in vitro*におけるP-Rex1のGEF活性に対するリン酸化の影響。P-Rex1をPKAとATP存在下で 30°C で2時間リン酸化させた。His-Rac1、 $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 、 PIP_3 存在下で 20°C でインキュベーションしHis-Rac1への $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ の結合量を解析した。対照にはPKA非存在下で同様のリン酸化反応を行ったP-Rex1を使用した。×はP-Rex1を加えない条件、○はP-Rex1単独、●はP-Rex1と $\text{G}\beta\gamma$ 、■はリン酸化させたP-Rex1と $\text{G}\beta\gamma$ を加えた条件。

D) *in vitro*における $\text{G}\beta\gamma$ とP-Rex1の結合に対するP-Rex1リン酸化の影響。 $\text{G}\beta_1\gamma_2$ とリン酸化反応させたP-Rex1の結合強度を表面プラズモン共鳴法により解析した。黒はATPを加えずにリン酸化処理を行ったP-Rex1のセンサーチップへの結合、灰色はATPを加えリン酸化処理を行ったP-Rex1のセンサーチップへの結合を示した。

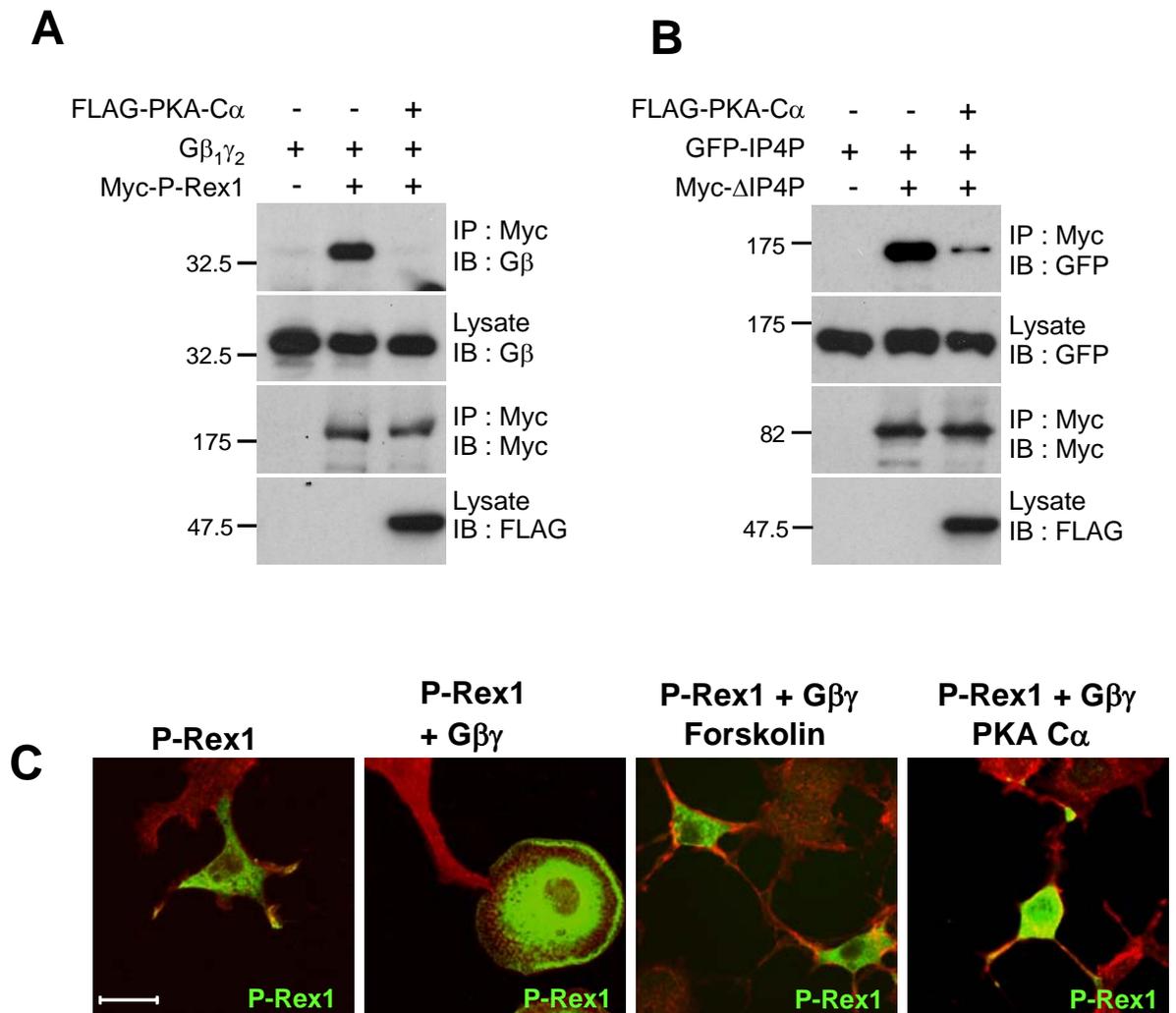
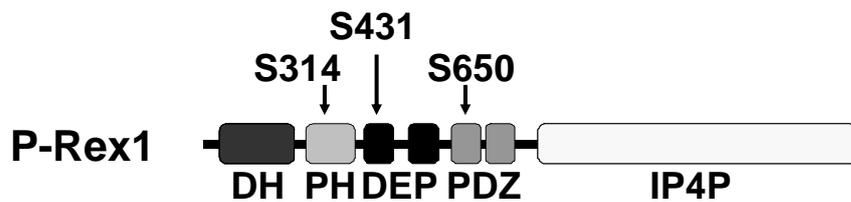


図18 細胞内におけるP-Rex1のPKAによる制御

- A.B) HEK293T細胞にFLAG-PKA-C α , G $\beta_1\gamma_2$ とMyc-P-Rex1の野生型または変異体を図中に記載した通りに過剰発現させ、48時間後に細胞を回収してanti-Myc抗体による免疫沈降を行った。細胞ライセートと免疫沈降物に含まれるG β , FLAG-PKA-C α , Myc-P-Rex1の野生型または変異体とGFP-P-Rex1-IP4Pをウエスタンブロットにより検出した。三回以上の独立した実験を行い、その全てにおいて同様の結果が得られた。
- C) PDLコートしたガラスカバー上のNIH-3T3細胞にMyc-P-Rex1とG $\beta_1\gamma_2$ を過剰発現させ36時間後に細胞を固定し免疫染色を行った。Myc-P-Rex1 (緑)をanti-Myc抗体を使用して染色し、アクチン繊維 (赤)をPhalloidinを使用して染色した。フォルスコリン処理は固定前の6時間行った。



m/z	Charge	Residues	Sequence	Mass	Neutral loss of H ₃ PO ₄
625.30	2+	314-323	pSINGSLYIFR	1248.59	observed
426.73	2+	429-435	KLpSTVPK	851.44	observed
678.79	2+	649-661	GpSLAEM*AGLQAGR	1355.57	observed
905.94	2+	645-661	SVQRGpSLAEMAGLQAGR	1809.87	observed
862.35	2+	1566-1580	LGACQITMCGTGMR	1722.68	n.d.

図19 P-Rex1のPKAによるリン酸化部位の同定

P-Rex1をATPとPKAを含む反応液中で30℃で2時間リン酸化させた。反応液をSDS-PAGEにより展開しCBB染色した後、P-Rex1に対応したバンドを切出しトリプシン消化を行い、質量分析装置により解析を行った。Aに同定された三箇所のリン酸化部位の模式図を示す。表に同定されたリン酸化ペプチドの質量電荷比(m/z)、電荷(charge)、位置(residues)、アミノ酸配列(sequence)、質量(Mass)、ニュートラルロスの検出の有無(Neutral loss of H₃PO₄)を示す。pSはリン酸化されたセリンを、M*は酸化されたメチオニンを表す。1566-1580残基に対応するペプチドはリン酸化されていたが、2箇所のスレオニンのどちらがリン酸化されるかは未同定。n.d. ; not detected

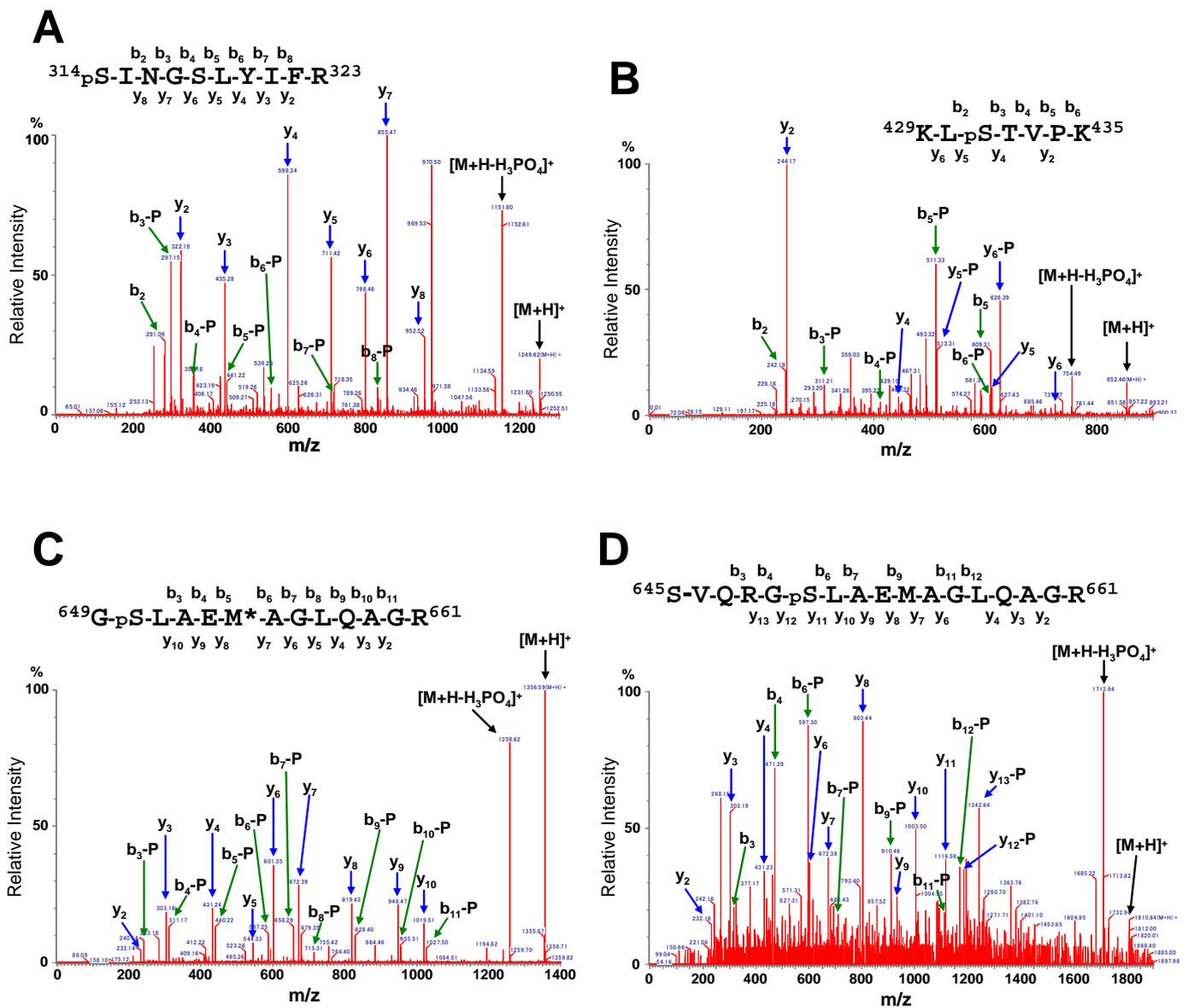
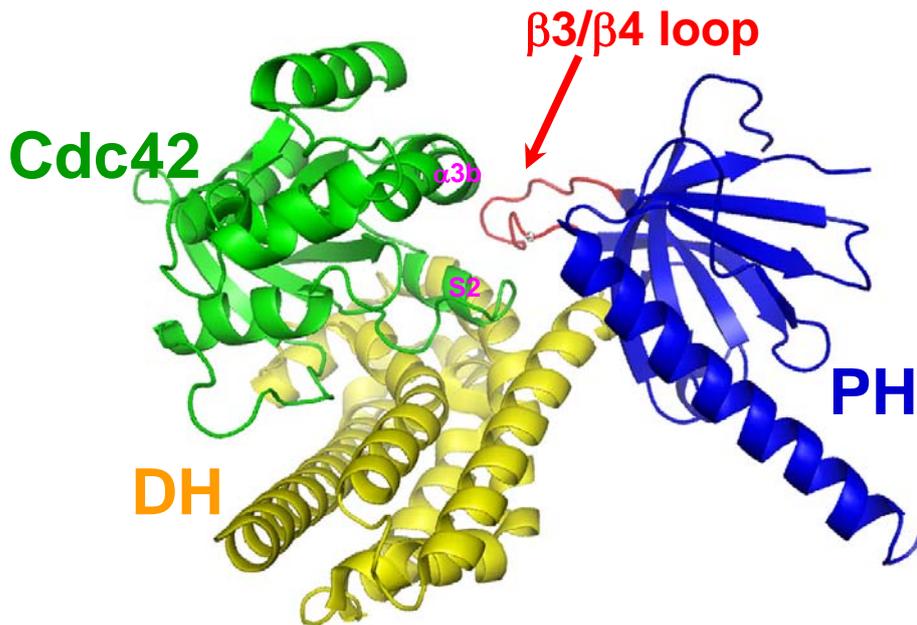


図20 P-Rex1のPKAによるリン酸化部位のMS/MS解析

P-Rex1の314番目(A)、413番目(B)、650番目(C,D)のセリンを含むリン酸化ペプチドのMS/MS解析の結果を示す。青や緑の矢印で示したピークの質量電荷比は、 y_x と記載された切断部位からC末端までの質量電荷比、N末端から b_x と記載された切断部位までの質量電荷比に等しい。黒の矢印で示した2本のピークは H_3PO_4 の質量である98 Daのニュートラルロスを示す。ペプチド配列に記されたpSはリン酸化されたセリンを、M*は酸化されたメチオンを表す。

A



B

P-Rex1

	β3	β3/β4 loop	β4	
Mus musculus	291:NLLVYCKRKSRVTGSKKSTKRTKS	314	SINGSLYIFRGRINT	328
Rattus norvegicus	291:.....		328
Homo sapiens	296:.....		333
Bos taurus	228:.....G.....		265
Canis familiaris	292:.....G.....		329
Gallus gallus	278:.....A.-.PS.....		314
Ornithorhynchus anatinus	249:.....		286
Monodelphis domestica	301:.....G..A.....		338
Danio rerio	273:.....S.-.....PQ.V.....		309
Xenopus laevis	271:.....A.-.....S.....		307
	*****.* **.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*			
Mus musculus P-Rex2	262:NLLVYCKRKHRRLLKNSKAST		-----DGYRYVFRGRINT	294
Mus musculus Dbs	869:-AVLFCKKREENGEGYEK		-----APSYSYKQSLN-	895
Consensus sequence (Pfam)	:DVLLEYKDKK-----SKPKGSIPL			

図21 P-Rex1の314番目のセリンの構造学的考察と近傍のアラインメント

- A) DbsのDH/PHドメインとCdc42の複合体結晶構造 (Rossman KL, et. al., 2002)。DbsのPHドメインのβ3/β4ループはCdc42のαヘリックス(図中:α3b)とスイッチII領域(図中:S2)と結合している。
- B) P-Rex1のPHドメインのβ3/β4ループのアラインメントを示す。P-Rex1の314番目のセリンはPHドメインのβ3/β4ループに位置している。PKAの認識配列(R/K-R/K-X-S/T)は白黒反転させ示した。灰色で網掛したセリン及びスレオニンは、PKAの認識配列を保持しリン酸化される可能性がある。β3/β4ループにはPKA認識配列のクラスターが存在する。

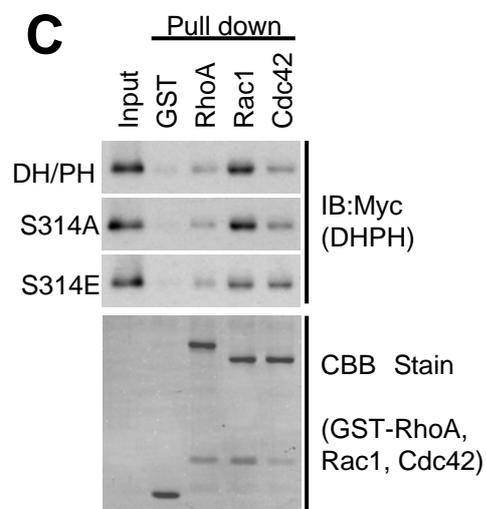
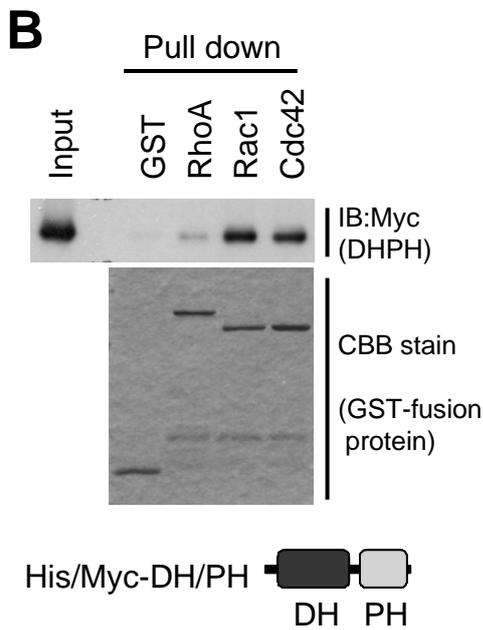
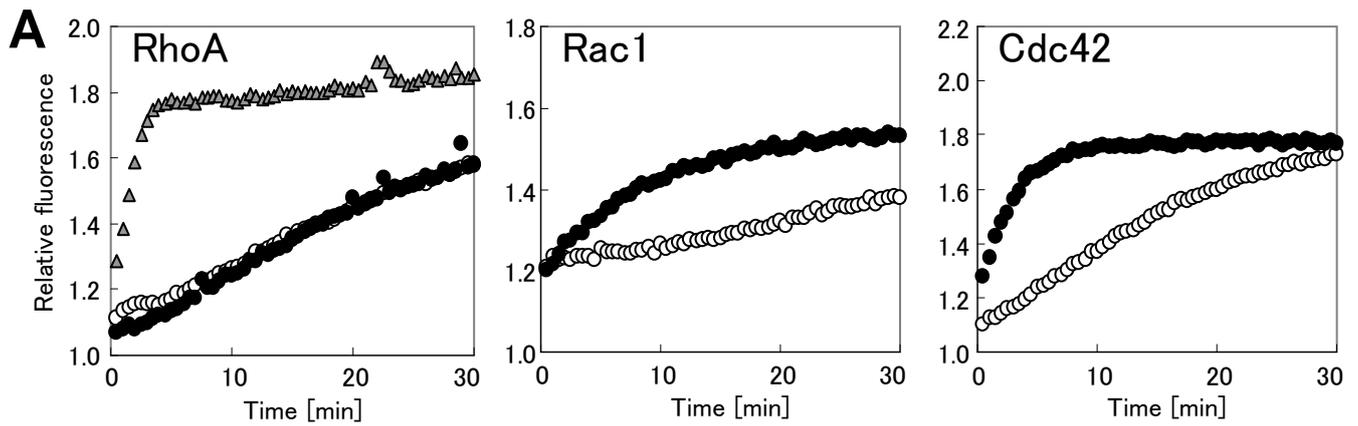


図22 P-Rex1の314番目のセリン残基のリン酸化の機能解析

- A) P-Rex1の恒常的活性型変異体(P-Rex1-DH/PH)のRhoA, Rac1, Cdc42に対するGEF活性。GST-RhoA, Rac1, Cdc42へのMANT-GMPPNPの結合を蛍光強度から評価した。RhoファミリーGタンパク質を加えない条件での蛍光強度を1として各条件での蛍光強度の相対値を算出した。His/Myc-P-Rex1-DH/PH存在下(●)、非存在下(○)並びに15 mM EDTA存在下(▲, RhoAのみ)での蛍光強度の相対値をグラフに示した。
- B,C) His/Myc-DH/PH, DH/PH-S314AおよびDH/PH-S314EとGST, GST-RhoA, GST-Rac1およびGST-Cdc42の組換えタンパク質を図中に記した通りに混合し、Glutathione Sepharose 4Bを使用したプルダウン法により結合を解析した。

P-Rex1

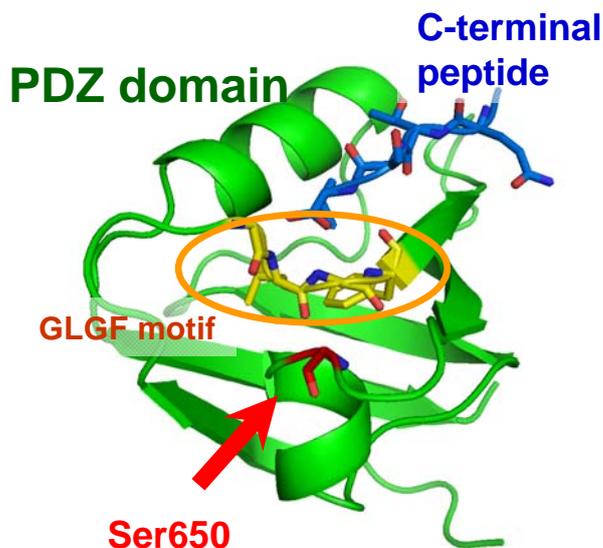
		431	
Mus musculus	411:LYHMMMSKKVNLIKDRR	RKL	STVPKCFLGNEFVAWLLEI 449
Rattus norvegicus	411:.....	RKL 449
Homo sapiens	416:.....N.....	RKL 454
Bos Taurus	348:.....	RKL 386
Canis familiaris	412:.....N.....	RKL 540
Gallus gallus	397:..Q.....	RKLS..TD. 435
Ornithorhynchus anatinus	369:..K.....	RKLI.. 407
Monodelphis domestica	421:.....	RKLI.. 459
Danio rerio	392:.....T.NRH.....	RKL	..IN.....S....S 430
Xenopus laevis	390:....V-..RSS.....	RKL	..F..I....H...L.S..M.N 427
		RKL	*****.....*****.....**..
Mus musculus P-Rex2	377:LYKMMCKQGNIKDRR	RKL	LTTFPKCFLGSEFVSWLLEIG 415

図23 P-Rex1の431番目のセリン近傍のアラインメント

P-Rex1の1stDEPドメインの431番目のセリン近傍のアラインメントを示す。

PKAの認識配列(R/K-R/K-X-S/T)は白黒反転させ示した。

A



B

P-Rex1

Mus musculus	628:DDYGF	666
Rattus norvegicus	628:.....	666
Homo sapiens	633:E.....I.....V.....V.....	671
Bos Taurus	565:E.....I.....V.....F..	603
Canis familiaris	629:.....I.....D.....V.....	667
Gallus gallus	614:.....V.....I.....R.....S.....	652
Ornithorhynchus anatinus	586:E.....I.....I.....V.....	624
Monodelphis domestica	638:.....I.....VI.....V.....	676
Danio rerio	609:E.....EI.....II.....S.....Y.....P.....	647
Xenopus laevis	606:E.....D.....I.....RK.....Y.....V.....	644
	****.*.***.****.*.*.****.****.*	
Mus musculus P-Rex2	593:GSYGF	631

図24 P-Rex1の650番目のセリンの構造的考察と近傍のアラインメント

- A) PSD-95の3番目のPDZドメインの結晶構造 (Doyle et al., 1996)。PDZドメインと結合するタンパク質のC末端配列を青で示した。C末端配列との結合に係るGLGFモチーフを黄色で示した。アミノ酸配列の比較からP-Rex1の650番目のセリンに相当する部位を赤で示した。
- B) P-Rex1の1stPDZドメインの650番目のセリン近傍のアラインメントを示す。PKAの認識配列(R/K-R/K-X-S/T)は白黒反転させ示した。第一章で作製したP-Rex1-1stPDZ_{AAAA}変異体の変異導入部位(DYGF, 629-632 aa)を灰色で網掛した。この4残基はPDZドメインがC末端配列と結合するのに係る。

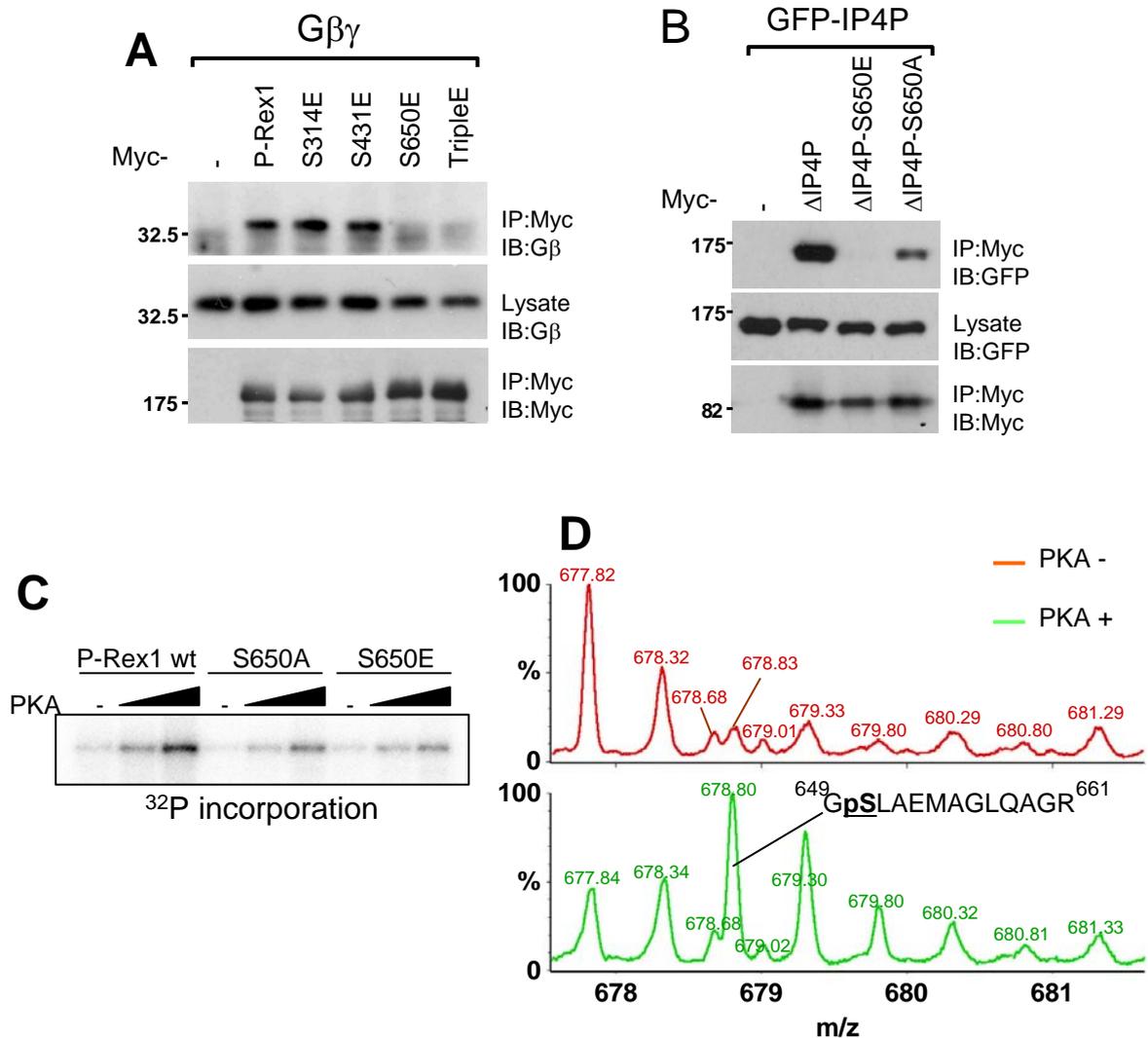


図25 P-Rex1の650番目のセリン残基のリン酸化の機能解析

- A.B) HEK293T細胞に $G\beta_1\gamma_2$ とMyc-P-Rex1全長または変異体を図中に記載した通りに過剰発現させ、48時間後に細胞を回収してanti-Myc抗体による免疫沈降を行った。細胞ライセートと免疫沈降物に含まれる $G\beta$ 、Myc-P-Rex1全長または変異体とGFP-P-Rex1-IP4Pをウェスタンブロットにより検出した。三回以上の独立した実験を行い、その全てにおいて同様の結果が得られた。
- C) P-Rex1をPKA(2.5 units/ μ l, 25 units/ μ l)と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を含む反応液中で 30°C で2時間リン酸化反応させた後SDS-PAGEによりタンパク質を分離し、P-Rex1への ^{32}P の取り込みを解析した。二回の独立した実験を行い、同様の実験結果が得られた。
- D) P-Rex1をPKAとATP存在下で 30°C で2時間リン酸化させた。P-Rex1のトリプシン消化ペプチドを質量分析法により解析し、リン酸化された650番目のセリン残基を含むペプチドピークを解析した。

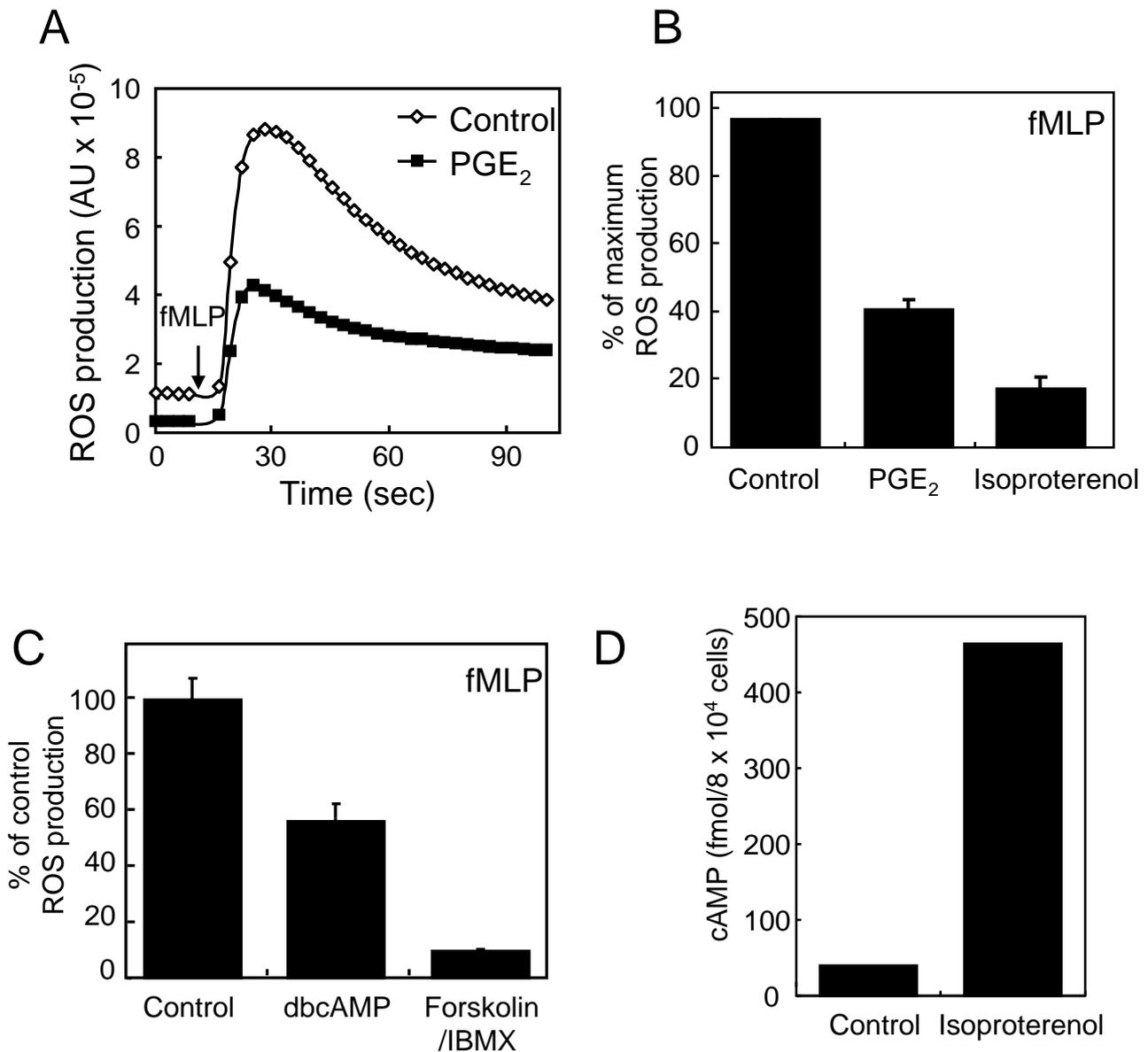


図26 好中球様細胞の活性酸素産生に対するPKAシグナルの役割

- A) 好中球様に分化させたHL-60細胞に1 μM PGE₂を37°Cで10分間以上前処理し1 μM fMLPによる活性酸素産生をL-012を用いた化学発光法により経時的に計測した。
- B,C) 好中球様に分化させたHL-60細胞に1 μM PGE₂、1 μM isoproterenol、200 μM dbcAMP、1 μM forskolin/0.1 μM IBMXを10分間以上作用させた。1 μM fMLP刺激による活性酸素の産生を測定し、対照のHL-60細胞が産生した活性酸素のピーク時の発光強度を100%として、各条件での相対的な発光強度を示した。
- D) 好中球様に分化させたHL-60細胞に10 μM isoproterenolを30分間作用させcAMPの産生量を測定した。

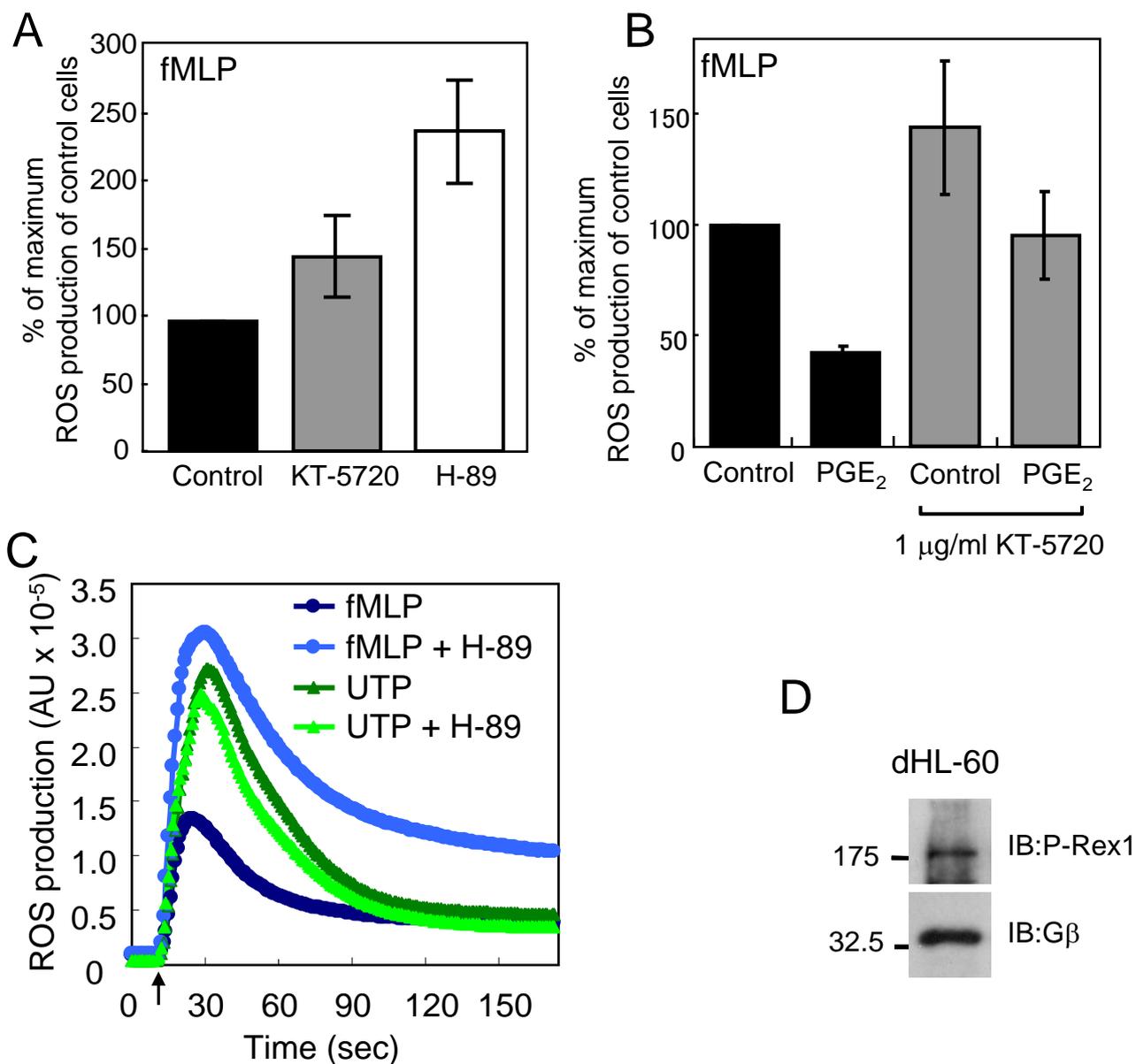


図27 好中球様細胞の活性酸素産生に対するPKA阻害剤の効果

- A,B) 好中球様に分化させたHL-60細胞に1 μg/ml KT-5720、1 μM H-89を37°Cで10分以上前処理し1 μM fMLPによる活性酸素産生をL-012を用いた化学発光法により経時的に測定した。対照のHL-60細胞が産生した活性酸素のピーク時の発光強度を100%として、各条件での相対的な発光強度を示した。Bでは1 μg/ml KT-5720、1 μM H-89を37°Cで5分間処理した後、1 μM PGE₂、1 μM isoproterenolを10分以上作用させた。
- C) 好中球様に分化させたHL-60細胞に10 μM H-89を37°Cで10分以上前処理し1 μM fMLP、10 μM UTPによる活性酸素産生をL-012を用いた化学発光法により経時的に計測した。三回の実験結果の平均をグラフに示した。矢印は1 μM fMLPを添加した時点を示す。
- D) 好中球様に分化させたHL-60細胞でのP-Rex1の発現をanti-P-Rex1抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。

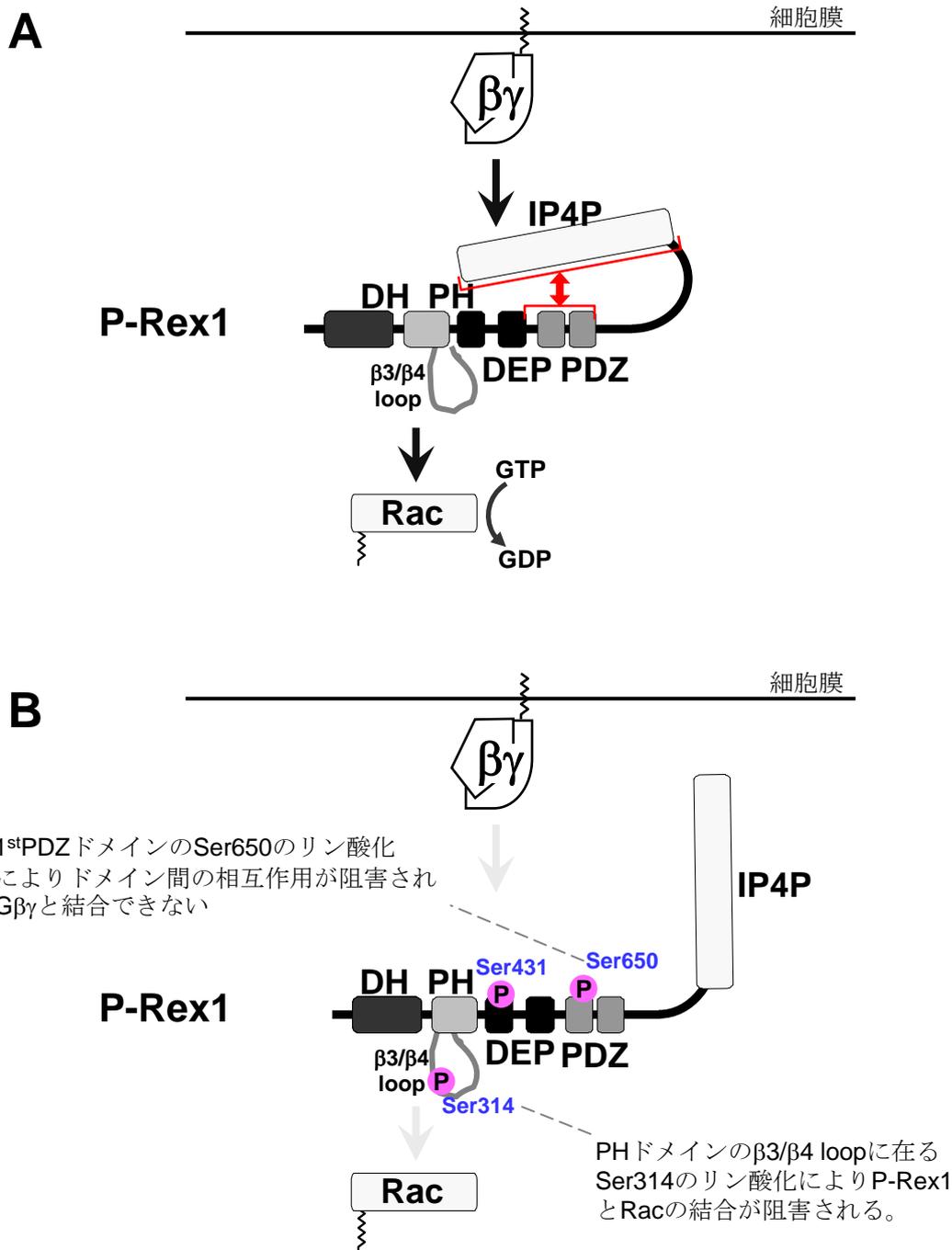


図28 P-Rex1のリン酸化による二段階抑制機構のモデル図

- A) リン酸化されていない状態では、P-Rex1の2ndDEP/1stPDZドメインはIP4Pドメインと分子内で相互作用(赤)を形成しており、G $\beta\gamma$ はP-Rex1と結合し活性化する。P-Rex1はDH/PHドメインでRacと結合しGEF活性を発揮する。P-Rex1のRacとの結合にはPHドメインの $\beta 3/\beta 4$ loopに係る。
- B) 650番目のセリン残基のリン酸化はP-Rex1の2ndDEP/1stPDZドメインとIP4Pドメインの相互作用を阻害するため、P-Rex1はG $\beta\gamma$ と結合できなくなる。314番目のセリン残基のリン酸化は $\beta 3/\beta 4$ loopとRacとの結合を阻害し、P-Rex1はRacと結合できなくなる。

< 結論 >

P-Rex1 は好中球の活性酸素産生を司る Rac-GEF として機能する。P-Rex1 は DH、PH、1stDEP、2ndDEP、1stPDZ、2ndPDZ、IP4P と多数のドメイン構造を有しており、その活性は PIP₃ と Gβγ により相乗的に促進され、PKA によりリン酸化を受け抑制される。本博士論文では P-Rex1 の Gβγ による活性化機構、および PKA による抑制機構の解明を目指し研究を行った。

第一章では Gβγ による P-Rex1 活性化機構の解析を行い、P-Rex1 は定常状態において 2ndDEP/1stPDZ ドメインと IP4P ドメインの間に相互作用を形成しており、このドメイン間の相互作用が Gβγ との結合並びに活性化に不可欠であることを明らかにした(図 16)。このドメイン間相互作用に関わる細かい領域について解析し、1stPDZ ドメインの C 末端配列結合部位と IP4P ドメインの C 末端配列が必要なことを示したが、1stPDZ ドメインと C 末端配列が相互作用するかは結論に至っていない。また、このドメイン間の相互作用は、分子内の相互作用に係ることを考察した。第一章の結果から P-Rex1 は複雑なドメイン間の相互作用により活性が制御されることが示唆され、セリン、スレオニン、チロシン残基のリン酸化やメチオニン残基の酸化などの翻訳後修飾や他の分子の会合などにより、この分子内相互作用が影響を受け P-Rex1 の活性が制御される可能性が考えられる。

第二章では、PKA によるリン酸化が P-Rex1 の活性を低下させる分子機構の解析を行った。そして PKA による P-Rex1 のリン酸化が、P-Rex1 の 2ndDEP/1stPDZ ドメインと IP4P ドメインの相互作用を阻害するとともに、P-Rex1 と Gβγ の結合親和性の低下および P-Rex1 活性化の阻害を引き起こすことを見出した。更に、P-Rex1 のリン酸化部位を 3 箇所同定し、PH ドメインのβ3/β4 ループに在る 314 番目のセリン残基のリン酸化が P-Rex1 と Rac との結合親和性を低下させる可能性、650 番目のセリン残基のリン酸化が 2ndDEP/1stPDZ ドメインと IP4P ドメインの相互作用並びに、P-Rex1 と Gβγ の相互作用を阻害することを示した。第二章の結果から、PKA によるリン酸化が、P-Rex1 の制御因子である Gβγ との結合を阻害するだけでなく、P-Rex1 の標的である Rac との結合も阻害するという二段階の抑制モデルを提唱した(図 28)。リン酸化が Rho ファミリー GEF (Rho-GEF) と制御因子、並びに Rho-GEF と効果器の結合親和性を同時に低下させることを示した例はなく、独創性の高い研究と考えられる。また第二章では、好中球様細胞で PKA を介するシグナル伝達経路により活性酸素の産生が抑制されることを確かめた。P-Rex1 は活性酸素の産生を司る Rac-GEF であり、この PKA シグナルによる活性酸素産生の抑制に P-Rex1 のリン酸化に係るかは大変興味深い。

本博士論文で行われたシグナル伝達分子の構造と機能を結び付ける研究は、新たな

創薬候補分子の発見へと繋がる可能性が期待できる。P-Rex1 の発現組織は成体では血球系の細胞に限局されており創薬のターゲットとしても魅力が高い。P-Rex1 の複雑なドメイン間の相互作用による活性制御機構と P-Rex1 が好中球で活性酸素産生を司ることを考え合せると、P-Rex1 のドメイン間の相互作用を阻害することで活性酸素の産生抑制作用や抗酸化ストレス作用が生じることが考えられ、動脈硬化や消化器疾患、悪性腫瘍などに関連する活性酸素による生体毒性を軽減できると期待される。

<謝辞>

本博士論文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 伊東広教授の御指導の下、筆者が博士後期過程に行った研究成果をまとめたものである。

伊東広教授には、絶えず適切な御指導並びに御鞭撻を賜り、本博士論文を完成まで導いていただきました。投稿論文の執筆の折には、論理構成の不備や拙い英語を何度と無く御添削していただきました。また、研究を進めるにあたり必要となる要素や、研究に携わるものとしての責任感など、これから研究を続ける私にとって大変貴重な数多くの御助言、御指導を賜りました。心からの感謝と御礼を申し上げます。

稲垣直之准教授には、異なる視点からの有益な御助言を賜りました。水野憲一助教には、数々の御助言や投稿論文の校正をしていただきました。多胡憲治助教には、日々の実験結果に対する御指摘、御助言、御討論を賜るばかりでなく、研究が滞りうつむく私を常に励まし続けていただきました。島田忠之助教には、常に的確で有益な数多くの御助言を賜りました。愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所神経制御学部の浅野富子室長には anti-G γ ₂₇ 抗体を供与いただきました。京都大学医学研究科腫瘍生物学講座吉澤匡人博士、星野幹雄助手（現 国立精神神経センター神経研究所 部長）には、抗 P-Rex1 血清を供与いただきました。これらの先生方に、心からの感謝と御礼を申し上げます。

最後に 6 年間の研究生生活を見守り、支えて下さった両親に心からの感謝と御礼を申し上げます。

2008 年 5 月 20 日

浦野 大輔

<引用文献>

Ahmed, M. U., Hazeki, K., Hazeki, O., Katada, T., and Ui, M. (1995). Cyclic AMP-increasing agents interfere with chemoattractant-induced respiratory burst in neutrophils as a result of the inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase rather than receptor-operated Ca²⁺ influx. *J Biol Chem* 270, 23816-23822.

Ambruso, D. R., Knall, C., Abell, A. N., Panepinto, J., Kurkchubasche, A., Thurman, G., Gonzalez-Aller, C., Hiester, A., deBoer, M., Harbeck, R. J., *et al.* (2000). Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4654-4659.

Asano, T., Morishita, R., Ohashi, K., Nagahama, M., Miyake, T., and Kato, K. (1995). Localization of various forms of the gamma subunit of G protein in neural and nonneural tissues. *J Neurochem* 64, 1267-1273.

Ballon, D. R., Flanary, P. L., Gladue, D. P., Konopka, J. B., Dohlman, H. G., and Thorner, J. (2006). DEP-domain-mediated regulation of GPCR signaling responses. *Cell* 126, 1079-1093.

Barber, M. A., Donald, S., Thelen, S., Anderson, K. E., Thelen, M., and Welch, H. C. (2007). Membrane translocation of P-Rex1 is mediated by G protein betagamma subunits and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 282, 29967-29976.

Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P. J., and Gierschik, P. (1992). Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature* 360, 684-686.

Chen, C. A., and Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6, 632-638.

Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., and Gallo, R. C. (1978). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar

compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2458-2462.

Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., and Gallo, R. C. (1979). Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J Exp Med* 149, 969-974.

Decoursey, T. E., and Ligeti, E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci* 62, 2173-2193.

Diekmann, D., Abo, A., Johnston, C., Segal, A. W., and Hall, A. (1994). Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 265, 531-533.

Donald, S., Hill, K., Lecureuil, C., Barnouin, R., Krugmann, S., John Coadwell, W., Andrews, S. R., Walker, S. A., Hawkins, P. T., Stephens, L. R., and Welch, H. C. (2004). P-Rex2, a new guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *FEBS Lett* 572, 172-176.

Dong, X., Mo, Z., Bokoch, G., Guo, C., Li, Z., and Wu, D. (2005). P-Rex1 is a primary Rac2 guanine nucleotide exchange factor in mouse neutrophils. *Curr Biol* 15, 1874-1879.

Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., and MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85, 1067-1076.

el Benna, J., Faust, L. P., and Babior, B. M. (1994). The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem* 269, 23431-23436.

Eva, A., and Aaronson, S. A. (1985). Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* 316, 273-275.

Feng, Q., Baird, D., and Cerione, R. A. (2004). Novel regulatory mechanisms for the Dbl family guanine nucleotide exchange factor Cool-2/alpha-Pix. *Embo J* 23, 3492-3504.

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

- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
- Hart, M. J., Shinjo, K., Hall, A., Evans, T., and Cerione, R. A. (1991). Identification of the human platelet GTPase activating protein for the CDC42Hs protein. *J Biol Chem* 266, 20840-20848.
- Heyworth, P. G., Cross, A. R., and Curnutte, J. T. (2003). Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol* 15, 578-584.
- 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.
- Hill, K., Krugmann, S., Andrews, S. R., Coadwell, W. J., Finan, P., Welch, H. C., Hawkins, P. T., and Stephens, L. R. (2005). Regulation of P-Rex1 by phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate and Gbetagamma subunits. *J Biol Chem* 280, 4166-4173.
- Hill, K., and Welch, H. C. (2006). Purification of P-Rex1 from neutrophils and nucleotide exchange assay. *Methods Enzymol* 406, 26-41.
- Hillier, B. J., Christopherson, K. S., Prehoda, K. E., Brecht, D. S., and Lim, W. A. (1999). Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* 284, 812-815.
- Ii, M., Yoshida, H., Aramaki, Y., Masuya, H., Hada, T., Terada, M., Hatanaka, M., and Ichimori, Y. (1993). Improved enzyme immunoassay for human basic fibroblast growth factor using a new enhanced chemiluminescence system. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 540-545.
- Imada, I., Sato, E. F., Miyamoto, M., Ichimori, Y., Minamiyama, Y., Konaka, R., and Inoue, M. (1999). Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal Biochem* 271, 53-58.
- Joseph, R. E., and Norris, F. A. (2005). Substrate specificity and recognition is conferred by the pleckstrin homology domain of the Dbl family guanine nucleotide exchange factor P-Rex2. *J Biol Chem* 280, 27508-27512.

Katz, A., Wu, D., and Simon, M. I. (1992). Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature* 360, 686-689.

Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y. N., and Sheng, M. (1995). Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 378, 85-88.

Knaus, U. G., Morris, S., Dong, H. J., Chernoff, J., and Bokoch, G. M. (1995). Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein--coupled receptors. *Science* 269, 221-223.

Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., and Seeburg, P. H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737-1740.

Kozasa, T., and Gilman, A. G. (1995). Purification of recombinant G proteins from Sf9 cells by hexahistidine tagging of associated subunits. Characterization of alpha 12 and inhibition of adenylyl cyclase by alpha z. *J Biol Chem* 270, 1734-1741.

Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 15, 1942-1952.

Li, S., Yamauchi, A., Marchal, C. C., Molitoris, J. K., Quilliam, L. A., and Dinauer, M. C. (2002). Chemoattractant-stimulated Rac activation in wild-type and Rac2-deficient murine neutrophils: preferential activation of Rac2 and Rac2 gene dosage effect on neutrophil functions. *J Immunol* 169, 5043-5051.

Mahadeo, D. C., Janka-Junttila, M., Smoot, R. L., Roselova, P., and Parent, C. A. (2007). A chemoattractant-mediated Gi-coupled pathway activates adenylyl cyclase in human neutrophils. *Mol Biol Cell* 18, 512-522.

Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z. S., and Lim, L. (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367, 40-46.

Mayeenuddin, L. H., and Garrison, J. C. (2006). Phosphorylation of P-Rex1 by the cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate and Gbetagamma-mediated regulation of its activity. *J Biol Chem* 281, 1921-1928.

Mayeenuddin, L. H., McIntire, W. E., and Garrison, J. C. (2006). Differential sensitivity of P-Rex1 to isoforms of G protein betagamma dimers. *J Biol Chem* 281, 1913-1920.

Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I., and Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113, 329-342.

Mitsuyama, T., Takeshige, K., Furuno, T., Tanaka, T., Hidaka, K., Abe, M., and Hara, N. (1995). An inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase enhances the superoxide production of human neutrophils stimulated by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Mol Cell Biochem* 145, 19-24.

Nishida, K., Kaziro, Y., and Satoh, T. (1999). Anti-apoptotic function of Rac in hematopoietic cells. *Oncogene* 18, 407-415.

Nobes, C. D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.

Orlic, T., Loomis, W. H., Shreve, A., Namiki, S., and Junger, W. G. (2002). Hypertonicity increases cAMP in PMN and blocks oxidative burst by PKA-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C1261-1269.

Ridley, A. J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.

Roberts, A. W., Kim, C., Zhen, L., Lowe, J. B., Kapur, R., Petryniak, B., Spaetti, A., Pollock, J. D., Borneo, J. B., Bradford, G. B., *et al.* (1999). Deficiency of the hematopoietic cell-specific

Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity* 10, 183-196.

Rosenfeldt, H., Vazquez-Prado, J., and Gutkind, J. S. (2004). P-REX2, a novel PI-3-kinase sensitive Rac exchange factor. *FEBS Lett* 572, 167-171.

Rossmann, K. L., Cheng, L., Mahon, G. M., Rojas, R. J., Snyder, J. T., Whitehead, I. P., and Sondek, J. (2003). Multifunctional roles for the PH domain of Dbs in regulating Rho GTPase activation. *J Biol Chem* 278, 18393-18400.

Rossmann, 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.

Rossmann, K. L., Worthylake, D. K., Snyder, J. T., Siderovski, D. P., Campbell, S. L., and Sondek, J. (2002). A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange. *Embo J* 21, 1315-1326.

Rotrosen, D., and Leto, T. L. (1990). Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events. *J Biol Chem* 265, 19910-19915.

Sato, T., Irie, S., Kitada, S., and Reed, J. C. (1995). FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 268, 411-415.

Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-1609.

Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D. H., and Hirokawa, N. (2000). Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288, 1796-1802.

Snyder, J. T., Worthylake, D. K., Rossmann, K. L., Betts, L., Pruitt, W. M., Siderovski, D. P., Der, C. J., and Sondek, J. (2002). Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat Struct Biol* 9, 468-475.

Sottile, A., Venza, M., Venza, I., and Teti, D. (1995). Prostaglandins affect the respiratory burst of human neutrophils. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 17, 311-321.

Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B., and et al. (1995). Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269, 690-693.

Sun, Y., Yamauchi, J., Kaziro, Y., and Itoh, H. (1999). Activation of c-fos promoter by Gbetagamma-mediated signaling: involvement of Rho and c-Jun N-terminal kinase. *J Biochem (Tokyo)* 125, 515-521.

Takenawa, T., Ishitoya, J., and Nagai, Y. (1986). Inhibitory effect of prostaglandin E2, forskolin, and dibutyryl cAMP on arachidonic acid release and inositol phospholipid metabolism in guinea pig neutrophils. *J Biol Chem* 261, 1092-1098.

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.

Welch, H. C., Condliffe, A. M., Milne, L. J., Ferguson, G. J., Hill, K., Webb, L. M., Okkenhaug, K., Coadwell, W. J., Andrews, S. R., Thelen, M., *et al.* (2005). P-Rex1 regulates neutrophil function. *Curr Biol* 15, 1867-1873.

Werner, E. (2004). GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci* 117, 143-153.

Williams, D. A., Tao, W., Yang, F., Kim, C., Gu, Y., Mansfield, P., Levine, J. E., Petryniak, B., Derrow, C. W., Harris, C., *et al.* (2000). Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood* 96, 1646-1654.

Wong, H. C., Mao, J., Nguyen, J. T., Srinivas, S., Zhang, W., Liu, B., Li, L., Wu, D., and Zheng, J. (2000). Structural basis of the recognition of the dishevelled DEP domain in the Wnt signaling pathway. *Nat Struct Biol* 7, 1178-1184.

Yamauchi, J., Kaziro, Y., and Itoh, H. (1995). Carboxyl terminal of G protein beta subunit is required for association with gamma subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 214, 694-700.

Yamauchi, J., Kaziro, Y., and Itoh, H. (1999). Differential regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and 7 (MKK7) by signaling from G protein beta gamma subunit in human embryonal kidney 293 cells. *J Biol Chem* 274, 1957-1965.

Zhao, T., Nalbant, P., Hoshino, M., Dong, X., Wu, D., and Bokoch, G. M. (2007). Signaling requirements for translocation of P-Rex1, a key Rac2 exchange factor involved in chemoattractant-stimulated human neutrophil function. *J Leukoc Biol* 81, 1127-1136.

Zhu, K., Debreceni, B., Bi, F., and Zheng, Y. (2001). Oligomerization of DH domain is essential for Dbl-induced transformation. *Mol Cell Biol* 21, 425-437.

論文目録

所 属 (主指導教官)	細胞内情報学講座 (伊東 広 教授)		
氏 名	浦野 大輔	提 出	平成 20年 5月 7日
<p>学位論文の主たる部分を公表した論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)</p> <p>Domain-domain interaction of P-Rex1 is essential for the activation and inhibition by G protein $\beta\gamma$ subunits and PKA Daisuke Urano, Asuka Nakata, Norikazu Mizuno, Kenji Tago, and Hiroshi Itoh (2008) Cellular Signalling, 20, in press</p> <p>参考論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)</p> <p>三量体Gタンパク質. 浦野大輔, 伊東広 2008年8月 日本薬理学雑誌, Vol. 132, 印刷中</p>			