

論文内容の要旨

申請者氏名 浦野大輔

P-Rex1 は好中球において活性酸素の産生を司る Rac のグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)として機能する。P-Rex1 の GEF 活性は PIP₃ と Gβγにより相乗的に促進され、PKA によるリン酸化を受けると抑制される。P-Rex1 は DH、PH、1stDEP、2ndDEP、1stPDZ、2ndPDZ、IP4P と多数のドメイン構造を有している。申請者は P-Rex1 の Gβγによる活性化、リン酸化による抑制に関係するドメインの役割を解析した。その結果、Gβγによる活性化に必須となる P-Rex1 の分子内ドメイン間の相互作用を見出した。更に PKA によるリン酸化は P-Rex1 のドメイン間相互作用を阻害することで P-Rex1 の Gβγとの相互作用を抑制することを見出した。

まず申請者は、P-Rex1 と Gβγとの相互作用、P-Rex1 の Gβγによる活性化に必要なドメインを調べた。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成し、それらと Gβγとの相互作用を免疫沈降法により解析した。続いて *in vitro* における各 P-Rex1 変異体の Gβγによる活性化を評価した。さらに哺乳動物細胞内で活性型 Rac は、p21-activated kinase の自己リン酸化や血清応答配列下流の遺伝子発現、細胞辺縁部での葉状仮足の形成を促すため、これら Rac 依存性の応答に対する各 P-Rex1 変異体および Gβγの効果を検討した。その結果、P-Rex1 の IP4P ドメインが定常状態において P-Rex1 自身の 2ndDEP 及び 1stPDZ ドメインと分子内で相互作用すること、さらにこのドメイン間相互作用が P-Rex1 の Gβγとの結合及び活性化に必要なことを明らかにした。

次に申請者は、*in vitro* で PKA によりリン酸化を受けた P-Rex1 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との結合能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 の先に見出した Gβγとの相互作用に必要なドメイン間相互作用を阻害することを明らかにした。続いて質量分析法により P-Rex1 の 314 番目のセリン(Ser314)、431 番目のセリン(Ser431)、650 番目のセリン(Ser650)の三箇所を PKA によるリン酸化部位として同定した。このうち Ser650 は P-Rex1 のドメイン間相互作用に係る 1stPDZ ドメインに存在する。申請者は P-Rex1 の Ser650 の擬似リン酸化型変異体 (S650E) が、P-Rex1 のドメイン間相互作用を完全に阻害すると共に、P-Rex1 と Gβγの結合を弱めることを示した。また Ser314 は Rac との結合に関与する PH ドメインのβ3/β4 ループに存在すると考えられた。P-Rex1 の Ser314 に擬似リン酸化型変異 (S314E) を導入したところ P-Rex1 と Rac の結合が弱められた。以上の結果から、PKA による P-Rex1 のリン酸化が、制御因子である Gβγとの結合のみならず、効果器である Rac との結合を阻害するという 2 重の機構で P-Rex1 の活性を抑制する可能性が明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 浦野大輔

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関わり生命の維持に不可欠なシグナル伝達分子である。好中球において、三量体 G タンパク質は活性酸素産生あるいは過剰な活性酸素産生を抑制するシグナル伝達経路で働く。P-Rex1 は好中球の活性酸素産生を司り Rac のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として機能する。*In vitro* において、P-Rex1 は三量体 G タンパク質の $\beta\gamma$ 複合体 ($G\beta\gamma$) により活性化され、PKA によりリン酸化を受けるとその GEF 活性が低下する。申請者は P-Rex1 の活性制御に関係する特徴的な分子内ドメイン間の相互作用を見出し、 $G\beta\gamma$ による活性化機構並びにリン酸化による抑制機構を解明した。

まず申請者は、P-Rex1 の $G\beta\gamma$ による活性化機構を様々な P-Rex1 変異体を使用して解析した。免疫沈降法や BIACORE を用いた結合解析、*in vitro* における Rac-GEF 活性、哺乳動物細胞内での p21-activated kinase の自己リン酸化、血清応答配列の下流で起こる遺伝子発現、細胞辺縁部での葉状仮足の形成を指標にした解析から、P-Rex1 が分子内のドメイン間相互作用を持つこと、この分子内相互作用が P-Rex1 の $G\beta\gamma$ との結合及び活性化に必要なことを明らかにした。次に申請者は、PKA によるリン酸化がこの P-Rex1 の活性化に不可欠なドメイン間相互作用を阻害すること、P-Rex1 の $G\beta\gamma$ との結合能を低下させることを見出した。更に P-Rex1 のリン酸化部位を三ヶ所同定し、650 番目のセリンのリン酸化が P-Rex1 のドメイン間の相互作用を阻害するとともに、P-Rex1 と $G\beta\gamma$ の結合を阻害すること、314 番目のリン酸化が P-Rex1 と Rac との結合を抑制することを示した。

申請者は P-Rex1 の活性制御機構として (1) Rac-GEF として働く P-Rex1 が分子内ドメイン間の相互作用を利用して $G\beta\gamma$ による活性化を受け、(2) リン酸化によってその分子内相互作用が消失して $G\beta\gamma$ の作用を受けられなくなる、(3) さらに P-Rex1 の別の部位のリン酸化により Rac との作用も阻害されるという全く新しいいくつかの GEF の活性調節機構を提示しており、本研究結果は独創性が高い。また、好中球において種々の G タンパク質を介するシグナルにより活性酸素の産生が調節されることより、本研究の内容は好中球の活性酸素産生を調節するメカニズムの分子基盤を提示しており生体防御システムの理解の一助となる秀でた成果と言える。

以上のように、本論文は三量体 G タンパク質による P-Rex1 の活性制御機構について多くの知見をもたらすものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。