

三量体Gタンパク質G $\beta\gamma$ サブユニットにより制御される Rho特異的グアニンヌクレオチド交換因子

上田 浩

1. はじめに

細胞は、種々の細胞外刺激によりさまざまな細胞応答を引き起こす。それらの応答には、細胞移動、細胞分裂、細胞突起伸展や退縮等の細胞形態変化を伴う過程も含まれる。これまでさまざまな細胞において、細胞外刺激の一種である三量体GTP結合タンパク質（三量体Gタンパク質）共役型受容体（G-protein-coupled receptor：GPCR）を介するシグナルが、さまざまな細胞形態変化を引き起こすことが報告されてきた。また、それらの分子機構の一つとして、GPCRシグナルの下流で、細胞形態制御機構において重要な働きをすることが知られているRhoA, Rac, Cdc42等を含むRhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質（Rho）によるアクチン細胞骨格の時間的空間的な制御が存在することも明らかになってきた。しかしながら、それらの詳細な制御機構は、まだ不明な点が多く存在する。本稿では、その制御機構の一つとして、特に、三量体Gタンパク質のG $\beta\gamma$ サブユニットにより制御されるRho特異的グアニンヌクレオチド交換因子（Rho guanine nucleotide exchange factor：RhoGEF）について、我々の成果を中心に紹介したい。

2. Rhoの制御機構の一つとしてのRhoGEF

一般的にRhoは、他のGTP結合タンパク質（Gタンパク質）と同様に、不活性型のGDP結合型と活性型のGTP結合型の変換により、機能制御が行われる。一般的なGタンパク質と同様に、RhoのGDPとGTPの交換にも、主に二つの細胞内因子が関わっていることが知られている。一つは、上述したRhoのGDP型からGTP型への交換反応を促進し活性化させる分子であるRhoGEF、もう一つは、Gタ

ンパク質が持っているGTP加水分解活性を活性化させる分子で、Rho特異的に作用するGTPアーゼ活性化タンパク質（Rho GTPase-activating protein：RhoGAP）である。これらが細胞内におけるRhoの時間的空間的な制御に関与していると考えられている¹⁾。

RhoGEFは、現在、そのタンパク質構造から大きく二つのファミリーの存在が知られている。一つは、Dbl homology (DH) ドメインを含有するDblファミリーRhoGEFと、dedicator of cytokinesis (Dock) homology region (DHR) ドメインを持つDockファミリーRhoGEFである。DblファミリーRhoGEFは、現在、ヒト遺伝子上に少なくとも70種類存在することが知られており、それぞれに種々あるRhoに対する特異性が異なっていることが知られている²⁾。一方、DockファミリーRhoGEFは、現在、ヒト遺伝子上に11種類存在することが知られており、Rhoに対する特異性としては、RacおよびCdc42に対する特異性が高いことが知られている³⁾。

3. 三量体Gタンパク質G $\beta\gamma$ サブユニットによるDblファミリーRhoGEFの制御

一般的に、三量体Gタンパク質は、G α , G β , G γ の三つのサブユニットから構成されている。三量体Gタンパク質は、GPCRの刺激により、G α サブユニットに結合しているGDPがGTPに交換され、G α サブユニットが活性型になると同時に、活性型G α サブユニットとG $\beta\gamma$ サブユニットに解離し、それぞれが、さまざまなエフェクター分子に作用し、細胞応答に関与することが知られている⁴⁾。

GPCR刺激により遊離したG $\beta\gamma$ サブユニットにより活性化されるDblファミリーRhoGEFがいくつか報告されている。最も早く報告されたものは、PI 3-キナーゼの働きにより産生されるホスファチジルイノシトール3,4,5-トリスリン酸（phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate）とG $\beta\gamma$ サブユニットが直接作用して活性化し、Rhoの一種のRacを特異的に活性化させるphosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger (P-Rex) 1および2である^{5,6)}。そのタンパク質の構造は、DHドメイン、PHドメインの他に、DEPドメイン、PDZドメインなどの機能ドメインを有している（図1）。G $\beta\gamma$ サブユニットの結合部位について

岐阜大学工学部化学・生命工学科（〒501-1193 岐阜市柳戸1-1）
Heterotrimeric G protein G $\beta\gamma$ subunits-regulated Rho family
small G protein-specific guanine nucleotide exchange factors
Hiroshi Ueda (Department of Chemistry and Biomolecular Science,
Faculty of Engineering, Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193,
Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880416

© 2016 公益社団法人日本生化学会

は、各種機能ドメインがこれらの結合に関わっているというものや、DHドメインやPHドメインが重要であるといういくつかの報告があるが、現在のところ、その詳細は不明である。P-Rex1やP-Rex2は、好中球などの走化性や悪性黒色腫細胞や前立腺がん細胞の細胞移動に重要な働きをしているという報告があり、がん細胞の転移や浸潤など病態との関連が注目される。その他、現在までに報告されているGβγサブユニットにより活性化されるDblファミリーRhoGEFには、p114RhoGEFやARHGEF5/TIMなどもある(表1)。

我々は、P-Rex1や2以外にGβγサブユニットにより活性化されるRhoGEFの探索を行い、pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGEF domain) member 2(PLEKHG2)/FLJ00018を同定した⁷⁾。現在のところ、PLEKHG2のタンパク質構造中には、P-Rex1や2と異なり、DHドメイン、PHドメイン以外に機能ドメインは見いだされず、その構造からRhoGEF以外の機能を推定することは困難である(図1)。我々は、Gβγサブユニットの結合部位がN末端付近に存在するDHドメインに存在することを報告した(図2)。その後、Runneらが、C末端側にも結合部位が存在することを報告している⁸⁾。また、P-RexがRacに特異的に働くのに対し、PLEKHG2は、Racだけではなく、Cdc42にも作用する。さらに、PHドメインに対する各種リン脂質との結合についても、P-Rex1のPHドメインは、3位にリン酸基を持つイノシトールリン脂質に結合性を示したが、PLEKHG2のPHドメインは、ポリホスホイノシトールリン脂質およびホスファチジン酸との結合性を示し、両者でリン脂質特異性が異なることが明らかになった⁹⁾。

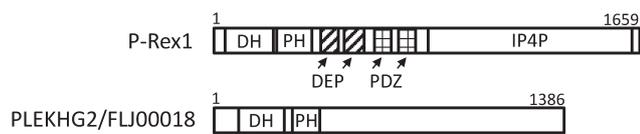


図1 三量体Gタンパク質Gβγ依存的DblファミリーRhoGEFのドメイン構造

P-Rex1は、PLEKHG2とは異なり、DEP、PDZ、IP4Pドメイン構造を有する。DH: Dbl homology, PH: plekstrin homology, DEP: Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin, PDZ: PSD95, Dlg1 and zo-1, IP4P: inositol polyphosphate-4-phosphatase.

表1 Gβγと相互作用することにより直接活性化されるRhoGEF

RhoGEF名	RhoGEFの機能等	Rho特異性
P-Rex1	白血球走化性やプルキンエ細胞の形態形成等 (Welch <i>et al.</i> , 2002, Welch <i>et al.</i> , 2005, Donald <i>et al.</i> , 2008)	Rac
PLEKHG2/FLJ00018	細胞伸展制御やリンパ球遊走制御 (Ueda <i>et al.</i> , 2008, Runne <i>et al.</i> , 2013)	Rac/Cdc42
ARHGEF5/TIM	未成熟骨髄由来樹状細胞走化性 (Wang <i>et al.</i> , 2009)	RhoA
p114RhoGEF	活性酸素産生と細胞形態制御 (Niu <i>et al.</i> , 2003)	Rac/RhoA

P-Rex1をはじめ、多くのRhoGEFは、それぞれが一つの細胞外シグナルだけで制御されるのではなく、複数のシグナルを受けとることができることが知られている。そこで、我々は、PLEKHG2の細胞機能を探るため、他の細胞内シグナルによるPLEKHG2のリン酸化や他の細胞内分子との相互作用について検討した。その一つとして、エフリンB2受容体(EphB2)刺激により活性化される非受容体型チロシンキナーゼの一つであるcSrcシグナルにより、PLEKHG2の489番目のチロシンがリン酸化されることが明らかになった(図2)。また、このリン酸化チロシンには、別のチロシンキナーゼであるABL1やPI3キナーゼの調節サブユニットであるPIK3R3が、それら分子が持つSrc homology 2ドメインを介して相互作用することを明らかにした¹⁰⁾。さらに、最近、上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor: EGFR)シグナルのβアドレナリン受容体刺激によるトランス活性化、あるいは、上皮成長因子による直接的な活性化により活性化されるRas/MAPキナーゼ経路を介して、PLEKHG2の680番目のトレオニンがリン酸化されることも見いだした(図2)。このトレオニンのリン酸化は、PLEKHG2のRhoGEF活性自体に直接影響を与えないが、Neuro-2a細胞において、EGFRによる突起伸展に影響を与えることを明らかにした¹¹⁾。一方、酵

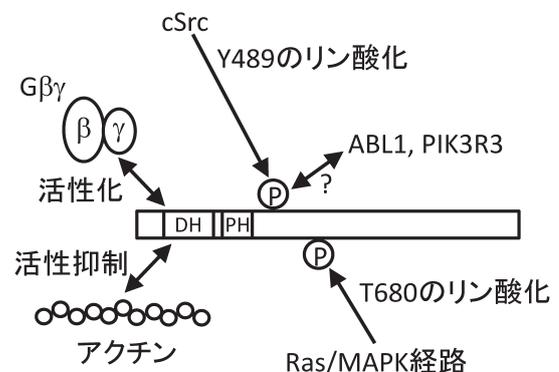


図2 PLEKHG2の他分子との相互作用とそのリン酸化
PLEKHG2はDHドメイン付近でのGβγとの相互作用で活性化され、アクチンとの相互作用により、その活性が抑制される。また、cSrcシグナルにより、489番目のチロシンがリン酸化され、そのリン酸化チロシンにABL1やPIK3R3などが相互作用する。さらに、活性化されたRas/MAPキナーゼ(MAPK)経路により、680番目のトレオニンがリン酸化される。

母ターハイブリッド法による相互作用タンパク質の探索の結果、細胞内アクチンが相互作用することが明らかになった。さらに、この相互作用はG $\beta\gamma$ サブユニットによるPLEKHG2のRhoGEF活性上昇を抑制することも明らかになった(図2)。また、アクチンは細胞内で球状アクチンと繊維状アクチンの二つの状態で存在し、活性化RacおよびCdc42は、繊維状アクチン量を増やすと考えられる。そして、細胞内アクチンは繊維状アクチンとしてPLEKHG2と結合しているという結果を得たことから、PLEKHG2と細胞内アクチンとの相互作用は、PLEKHG2活性化に対するネガティブフィードバック作用を持つものと考えられた¹²⁾。

4. おわりに

PLEKHG2をはじめ、現在まで報告されている三量体Gタンパク質各種サブユニットにより制御されるRhoGEFについては、どのサブユニットにより、どのRhoGEFが制御されるのかさらなる検討が必要である。同時に、創薬などの観点から、その構造や関連する病態などについてさらに詳細に検討されていくと考えられる。

謝辞

ここで紹介したPLEKHG2の研究の遂行に際しご協力い

ただきましたかずさDNA研究所 長瀬隆弘博士をはじめ多くの共同研究者の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) Hall, A. (2005) *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 891–895.
- 2) Schmidt, A. & Hall, A. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 1587–1609.
- 3) Laurin, M. & Côté, J.F. (2014) *Genes Dev.*, **28**, 533–547.
- 4) Hepler, J.R. & Gilman, A.G. (1992) *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 383–387.
- 5) Welch, H.C., Coadwell, W.J., Ellson, C.D., Ferguson, G.J., Andrews, S.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P.T., & Stephens, L.R. (2002) *Cell*, **108**, 809–821.
- 6) Rosenfeldt, H., Vázquez-Prado, J., & Gutkind, J.S. (2004) *FEBS Lett.*, **572**, 167–171.
- 7) Ueda, H., Nagae, R., Kozawa, M., Morishita, R., Kimura, S., Nagase, T., Ohara, O., Yoshida, S., & Asano, T. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 1946–1953.
- 8) Runne, C. & Chen, S. (2013) *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 4294–4307.
- 9) Kimura, S., Sato, K., Banno, Y., Nagase, T., & Ueda, H. (2013) *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 1204–1207.
- 10) Sato, K., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Kitade, Y., Nagase, T., & Ueda, H. (2014) *Cell. Signal.*, **26**, 691–696.
- 11) Sato, K., Sugiyama, T., Nagase, T., Kitade, Y., & Ueda, H. (2014) *J. Biol. Chem.*, **289**, 10045–10056.
- 12) Sato, K., Handa, H., Kimura, M., Okano, Y., Nagaoka, H., Nagase, T., Sugiyama, T., Kitade, Y., & Ueda, H. (2013) *Cell. Signal.*, **25**, 41–49.

著者寸描

●上田 浩 (うへだ ひろし)



岐阜大学工学部化学・生命工学科教授、博士(薬学)。

■略歴 1964年京都府に生る。88年名古屋市立大学薬学部卒業、93年大分医科大学助手、96年愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所研究員、2004年岐阜大学工学部生命工学科助教授、12年改組に伴い准教授、16年4月より現職。

■研究テーマと抱負 新しいGPCRシグ

ナル伝達経路の発見と生理機能を分子レベルで明確に示すことを目指しています。

■ウェブサイト http://www1.gifu-u.ac.jp/~mb3_ulab/

■趣味 読書。