

特定領域研究
「細胞情報ネットワークを統合するG蛋白質シグナル研究の新展開」

平成 18 年度 班会議

平成 18 年 9 月 5 日(火) ~ 6 日(水)

講 演 要 旨

新規 G タンパク質シグナル制御分子の構造と機能

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

【背景】

G タンパク質の機能を制御する分子として G タンパク質共役受容体 (GPCR) と Regulator of G protein signaling (RGS)、さらにコレラ毒素、百日咳毒素などがよく知られている。最近、土壌細菌 *Chromobacterium* sp. QS3666 株の培養液から ADP 誘発血小板凝集を抑制する分子として分子量約 1,000 の環状デブシペプチド YM-254890 が単離された。YM-254890 は様々な G_q 共役型受容体を介したシグナル伝達を特異的に阻害することから、 $G_{q/11}$ シグナルの選択的阻害剤と考えられているが、その阻害機構は不明である。一方、Ric-8 は線虫の遺伝学的解析から G タンパク質を介する神経伝達物質の放出に参与する分子として同定された。哺乳動物細胞には Ric-8A と Ric-8B の 2 種類のホモログが存在するが、それぞれの機能はほとんど明らかにされていない。

【これまでの研究成果】

酵母の Two-hybrid 法により Ric-8A、RGS ファミリー、AGS3、GRIN1、LGN など G タンパク質相互作用分子として単離した。哺乳動物細胞における Ric-8A の機能解析を組換え体タンパク質を用いた *in vitro* での実験と siRNA を用いた knock down 法により行ったところ、Ric-8A が $G_{\alpha q}$ に対する GEF 活性を示し GPCR の下流で G タンパク質シグナルを増強する因子として働くことが明らかとなった。また YM-254890 が Ric-8A による $G_{\alpha q}$ からの GDP の遊離を阻害するのみならず、自発的な $G_{\alpha q}$ からの GDP の遊離をも阻害することを見出した。一方、YM-254890 は $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha i1}$ 、 $G_{\alpha 13}$ の GDP/GTP 交換反応にはまったく影響を及ぼさなかった。さらに YM-254890 は AlF_4^- による $G_{\alpha q}$ の構造変化を阻害した。これらの結果から、YM-254890 が $G_{\alpha q}$ と特異的に結合して、GDP 結合フォームを安定化し、GDP の遊離を阻害する GDI として働く全く新しいタイプの G タンパク質シグナル制御分子であることが判明した。

【今後の研究計画】

GPCR による G タンパク質の活性化、すなわち GDP 遊離促進のメカニズムも実は判っていない。G タンパク質の活性化を正と負に制御する Ric-8A と YM-254890 の作用機構の詳細を調べることにより、この根本的な問題解決に近づくものと思われる。今後、Ric-8A、YM-254890 と G タンパク質との複合体の立体構造決定を目指す。また新たに G タンパク質相互作用分子として見出した Flotillin や AhR-interacting protein (AIP) の G タンパク質シグナルにおける役割を調べ、G タンパク質シグナルの特異性や伝達効率を規定する分子メカニズムの解明、さらに新たな細胞内シグナルネットワークの解析を行う。

RGS 蛋白質による G 蛋白質シグナルの生理的制御機構の解明

大阪大学大学院医学系研究科・薬理学講座
倉智 嘉久

【背景】

細胞膜微小構造である脂質ラフトはコレステロールやスフィンゴ脂質に富む不定形の膜画分である。この膜画分は種々の機能蛋白質を集積し、細胞膜を介するシグナル伝達、細胞内小胞輸送等の分子トラフィックを担うプラットフォームとして機能すると推定されている。シグナル分子である G 蛋白質も、脂質ラフトに集積する機能蛋白質の一つである。しかしながら、G 蛋白質シグナルにおける脂質ラフトの関与について、不明な点が多い。

RGS (Regulators of G protein signaling) 蛋白質は G 蛋白質 α サブユニットの GTP 水解活性を促進する G 蛋白質シグナルの生理的調節因子である。心筋細胞の RGS 蛋白質は定常状態では細胞膜のリン脂質 (PIP₃) によって機能が抑制されており、この抑制は Ca²⁺/CaM によって解除される。PIP₃ 等の特定のリン脂質もまた、蛋白質と同様に脂質ラフトに集積していることが知られている。そのため、RGS 蛋白質による G 蛋白質シグナルの生理的制御は、脂質ラフトを反応の場とする可能性が示唆された。

【これまでの研究成果】

1) CaM、RGS 蛋白質、脂質ラフトの相互作用

CaM、RGS 蛋白質、脂質ラフトの生理的連関を、蛍光共鳴エネルギー転移現象に基づき、発現系を用いて解析した。その結果、a) CaM と RGS は、細胞外から流入する Ca²⁺ 依存的に結合すること、b) 脂質ラフトが両者の結合する場であること、c) RGS4 はパルミチン酸化に依存して、脂質ラフトへ集積することが明らかとなった。

2) G 蛋白質シグナルにおけるシグナル分子群と脂質ラフトとの関係

モデル神経細胞 NG108-15 細胞には、G 蛋白質共役型受容体で制御される神経型 Ca²⁺チャネルが発現している。この細胞膜を脂質ラフト、non-ラフトに分画すると、オピオイド受容体、Ca²⁺チャネルは non-ラフトに、G 蛋白質 G _{α i/o} や G _{β (γ)} は両方の画分に存在した。この脂質ラフトに存在する G 蛋白質の殆どはオピオイド受容体刺激に伴い、non-ラフト画分に移行した。そのため、細胞膜での G 蛋白質の動的な移行が G 蛋白質シグナルに関与する可能性が示唆された。

【今後の研究計画】

今後は、1)細胞外からの Ca²⁺流入経路の同定、2)RGS 蛋白質の生理機能の解明、3)RGS 蛋白質と Ca²⁺/CaM や PIP₃ との複合体の構造解析、4)RGS 蛋白質による G 蛋白質サイクル制御の数値モデルの構築を中心に解析を進めていく予定である。

G蛋白質によるイオンチャンネルの調節機構: 1分子イメージング解析

東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・神経情報伝達研究チーム
額田敏秀、中田博子

【背景】

我々はこれまでに、電位依存性N型Ca²⁺チャンネルは、1)チャンネル1BサブユニットC末端とG α との、2)1BのリピートI-II間の細胞内ループとG $\beta\gamma$ との、双方の直接的な相互作用により抑制を受けることを明らかにした。一方、P/Q型チャンネル活性の抑制は、チャンネル1AサブユニットC末端とG α との直接的な相互作用に大きく依存した。さらに、受容体刺激によるP/Q型チャンネルの脱分極抵抗性の抑制が、1A C末端とG α との相互作用に依るものであり、その際、G α のN末端が重要な役割を果たした。

【これまでの研究成果】(従来の蛍光顕微鏡を用いた多分子の相加平均的観察)

上記の結果を踏まえて、1)G蛋白質とCa²⁺チャンネルをそれぞれ2種の蛍光蛋白質(CFPとYFP)を用いて可視化し、2)次に、CFPとYFP間のFluorescence Resonance Energy Transfer(FRET)を利用して、G蛋白質とCa²⁺チャンネル間の相互作用を検討した。G蛋白質側は、Go α のN端(lipid修飾部位の後方)またはhelicalドメインの第1ループに、さらにG $\beta 1$ のN端にもCFPを組み込んだCFP-G蛋白質を作製した。チャンネル側は、G蛋白質との相互作用領域である1B C末端とリピートI-II間の細胞内ループに、さらにN末端・リピートII-III間・III-IV間に、YFPを組み込んだYFP-N型1Bチャンネルを作製した。これらYFP-1B、CFP-G蛋白質を、予め外来性のCa²⁺チャンネル $\alpha 2/1$ 、 $\beta 1$ サブユニットを安定に発現させた動物培養細胞(BHK細胞)に発現させた時、細胞膜で両者の局在の一致が確認できた。この細胞でFRETの観察を行ったところ、Go α N端にCFPを組み込んだCFP-Go α とチャンネルC末端にYFPを組み込んだ1B-YFPチャンネルの組み合わせで、CFPの蛍光強度に対するYFPの蛍光強度の比(YFP/CFP比)が、オピオイド受容体刺激により経時的に変化した。この受容体刺激によるYFP/CFP比の経時変化は、強いレーザー光で蛍光蛋白質をブリーチさせた細胞では見られなかった。以上により、G α がチャンネル1BサブユニットのC末端を介して、実際に生きた細胞の中でN型チャンネルと相互作用することが分かった。

【今後の研究計画】

これまでの研究でYFP/CFP比の変化が確認できたCFP-Go α と1B-YFPチャンネルを、テトラサイクリン(Tet)とエクダイソン(Ecd)によりそれぞれ発現調節が可能なベクターを用いて培養細胞に導入し、TetとEcd濃度を変えることで、CFP-Go α と1B-YFPチャンネルが適量発現した細胞を選別する。選別した細胞を用いて、全反射蛍光顕微鏡システムにより1分子イメージングを行い、FRET解析によりG蛋白質とチャンネルの相互作用を検討する。このようにして樹立した1分子観察系に、Gサイクルの調節因子(RGS、AGSなど)を両方向性Tet発現ベクターを用いて導入する。Gサイクル調節因子がG蛋白質とCa²⁺チャンネルとの相互作用に対して与える影響を検討し、Gサイクル調節因子が持つ調節機構を1分子レベルで明らかにしていく。

ショウジョウバエ神経幹細胞における、Pins 結合蛋白質 Mud による 紡錘体方向の制御機構

理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・非対称細胞分裂研究グループ
泉 裕士

【背景】

細胞内因子等の非対称な局在を利用して、異なる姉妹細胞を産みだす非対称分裂は、多様な細胞を作り出す為に必須かつ普遍的な過程である。ショウジョウバエ神経幹細胞は、神経幹細胞自身と神経母細胞に非対称分裂するが、その際細胞運命決定因子が非対称に局在し、かつ分裂方向と一致する事により神経母細胞に選択的に分配される。我々は、神経幹細胞や胚上皮細胞の分裂方向が三量体 G 蛋白質 αi サブユニット ($G\alpha i$) とその GDP 解離抑制因子である Pins を介した共通のメカニズムで制御されている事を明らかにした。この事より Pins/ $G\alpha i$ 複合体は何らかの因子を介して紡錘体極を自身の方向へ引き寄せる機能を持つ事が考えられた。

【これまでの研究成果】

ショウジョウバエ胚抽出液から Pins の免疫沈降を行った所、coiled-coil 構造を持つ Mud 蛋白質の共沈降を検出した。Mud 蛋白質は、ショウジョウバエの脳構造の一部が異常になる mud 変異の原因遺伝子産物として同定されていたが、その細胞機能は明らかにされていなかった。神経幹細胞における Mud の局在を調べた所、Pins や $G\alpha i$ と同様にアピカル側細胞膜表層に局在し、かつ中心体周囲にも局在する事が判明した。Mud 蛋白質のアピカル側での局在は、Pins/ $G\alpha i$ 変異体で消失する事から、細胞膜表層での局在はこれらの機能に依存している事が分かった。さらに mud 変異体の神経幹細胞は、分裂方向の異常を示す事より、Pins/ $G\alpha i$ と Mud 蛋白質の相互作用は、神経幹細胞の分裂方向を細胞運命決定因子の局在と一致させるために重要である事が示唆された。

【今後の研究計画】

Mud 蛋白質の各種欠失変異体による、機能ドメインの同定：Mud の各種欠失変異体を神経幹細胞で発現させ、その局在及び機能に重要なドメインを同定する。さらに、Mud 変異体で Mud の Pins 結合能欠失変異体を発現させ、相互作用の重要性を確認する。Mud の相互作用因子の同定による、分子メカニズムのさらなる解明：既知の候補蛋白質（ダイニンなど）との相互作用の有無の検討、新規相互作用因子の免疫沈降、two-hybrid 実験等での検索。同定した相互作用因子の変異体、RNAi や過剰発現系を利用した表現型の検出を試みる。

三量体G蛋白質 サブユニットにより活性化される RhoGEF の同定

岐阜大学工学部生命工学科生命情報工学第2講座

上田 浩

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

浅野富子

【背景】

我々はこれまでに、三量体G蛋白質 サブユニットからのシグナルが、細胞遊走や伸展、あるいはアクチンストレスファイバーの構築などの細胞応答を制御していることを報告した。また、これらのシグナルに Rho ファミリー低分子量G蛋白質が関与していることを明らかにしてきた。これらの結果は により活性化される Rho ファミリー低分子量G蛋白質特異的なグアニンヌクレオチド交換因子 (RhoGEF) の存在を示唆しているので、その同定を試みた。また、同定された RhoGEF 分子が細胞伸展などに関与しているかどうかを明らかにしたいと考えた。

【これまでの研究成果】

かずさDNA研究所から供与されたヒト長鎖 cDNA クローンの中から DH ドメインおよび PH ドメインを持つクローンを選択し、細胞に 1 2 遺伝子と共発現した。Rho、Rac の活性化の指標として使用されている serum-response element (SRE) 依存的転写活性を測定して、 により活性化される RhoGEF クローンを同定した。その結果、いくつかのクローンが SRE 依存的転写活性を上昇させたが、その中で最も強い活性化を示したクローンは種々の サブユニットの活性化型遺伝子と共発現しても SRE 依存的転写活性を上昇させなかったため、 により特異的に活性化される分子と考えられ、 -RhoGEF とした。 -RhoGEF を m2-ムスカリン性アセチルコリン受容体と共発現させ、カルバコール刺激すると有意な SRE 依存的遺伝子発現の上昇が見られた。このカルバコール刺激による SRE 依存的遺伝子発現上昇は、百日咳毒素処理あるいは ARK との共発現により抑制された。以上の結果から -RhoGEF は、受容体刺激により Gi から遊離した により活性化される新規の RhoGEF であると考えられる。

【今後の研究計画】

-RhoGEF の活性化機構や機能について詳細な解析を行う。また、現在までに報告がある により活性制御を受けると考えられる P-Rex などの活性化機構と比較検討していく予定である。さらに、 により活性化される他の RhoGEF や サブユニットにより活性化される RhoGEF クローンも検索する予定である。

【背景】

我々はこれまでに、3量体Gたんぱく質によるcAMPシグナル制御、とりわけアデニル酸シクラーゼの活性制御について検討してきた。アデニル酸シクラーゼは生化学的性質の異なる9つのサブタイプからなり、Gたんぱく質に対する反応性も異なる。刺激性Gたんぱく質Gsによる被刺激性は共通するが、抑制性Gたんぱく質Giによる抑制効果はアデニル酸シクラーゼサブタイプによって異なり、1、5および6型においてのみ抑制があるとされたがこれらの持つ生理学的な意義は不明である。

【これまでの研究成果】

5型アデニル酸シクラーゼをノックアウトしたモデルおよび5型アデニル酸シクラーゼを心臓特異的に過大発現させたモデルを作成した。5型アデニル酸シクラーゼ欠損によってイソプロテレノール刺激によるcAMP産生は心臓および線条体において著名な減少を呈した。しかるに心臓における細胞死の発生は著名に減少していたが、線条体においては野生種との比較において不変であった。線条体においては、ドーパミン刺激による細胞死の亢進がみられたが、cAMP産生はイソプロテレノールに比較して低度であった。

【今後の研究計画】

以上の研究成果から、cAMPシグナルの細胞死に及ぼす影響は臓器特異性が強いこと、さらに同一の臓器であっても受容体の種類によって異なることが示唆された。さらに我々は、受容体のダウンレギュレーションのメカニズムおよびcAMPの下流シグナル系調節に違いがあることを見出している。

今後は、以下の点を中心に解析を進めていく。

アデニル酸シクラーゼのサブタイプごとに受容体レベルの調節に違いがあるのか。

アデニル酸シクラーゼによって生成されたcAMPの下流シグナルとして、旧来的なPKAシグナル以外のものの果たす役割は何か。またそれに臓器特異性は存在するのか。

三量体 G タンパク質の脂質ラフト局在と活性調節の分子メカニズムに関する研究

東北大学大学院薬学研究科・細胞情報薬学分野
中 畑 則 道

【背景】

スフィンゴ脂質、コレステロールやスフィンゴ糖脂質は「脂質ラフト」と呼ばれるマイクロドメインを細胞膜に形成しており、これは流動的なドメインと言われている。脂質ラフトは細胞内への物質輸送、ウィルス侵入など様々な事象に関与することが知られているが、近年、脂質ラフトには特定の脂質のみならず三量体 G タンパク質をはじめとする多数のシグナリング分子が集積することが示され、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を介するシグナル伝達が効率的に行われる場としても重要であることが示唆されている。

【これまでの研究成果】

以前よりわれわれはマストパランによる細胞情報伝達系に及ぼす影響について解析を進めてきたが、マストパランがイノシトールリン脂質 (PI) 代謝回転を抑制すること、プロスタグランジン E_2 生成を促進すること、ホスホリパーゼ D を活性化すること、グリコーゲンホスホリラーゼを介した筋小胞体から Ca^{2+} 遊離を引き起こすことなどを明らかにしてきた。

最近、PI 代謝回転をマストパランが抑制するメカニズムについて詳細に検討したところ、マストパランが脂質ラフトから G_{α_q} を遊離させることが明らかになった。マストパランの脂質ラフトにおける作用点は脂質ラフトに特異的に存在するガングリオシドであり、PI 代謝回転の抑制作用には G_i は関わっていないことが示唆された。すなわち、マストパランは脂質ラフトへの三量体 G タンパク質の局在を解析するツールとして極めて有用であると考えられる。しかし、ガングリオシドと G \cdot との相互作用の分子メカニズムや、 G_q 以外の G タンパク質の脂質ラフトにおける局在や活性調節におけるガングリオシドの役割については不明のままである。

【今後の研究計画】

そこで今後は、脂質ラフトにおける三量体 G タンパク質の活性調節機構の解明を目的として以下の研究を行う。すなわち、マストパランによって脂質ラフトから移動する成分を明らかにし、G タンパク質の脂質ラフトからの遊離の分子機構を明らかにするとともに、 G_q 以外の三量体 G タンパク質である G_s 、 G_i 、 $G_{12/13}$ の局在や活性調節におよぼすマストパランの作用を解析する。また、内因性の受容体アゴニストによる GPCR の刺激における G タンパク質活性化シグナルにおける脂質ラフトの意義について検討を加え、脂質ラフトにおける GPCR や三量体 G タンパク質の局在および活性調節機構を明らかにする。

脳内摂食受容体 G 蛋白質シグナルを調節する蛋白質の解析

埼玉医科大学・薬理学教室
斎藤祐見子 相崎良美

【背景】

RGS 蛋白質は、G 蛋白質 α サブユニットに対して負の制御因子として働き、G タンパク質結合型受容体(GPCR)シグナル伝達の強さ、持続時間および正確さに深く関与する。30 種以上ある RGS がどのように選択的に GPCR と相互作用し、G シグナリングを調節するか多くの点が未だ不明である。一方、メラニン凝集ホルモン(melanin-concentrating hormone: MCH)は、そのロックアウトにより摂食量が低下し体重が減少する(ヤセ:lean) 表現形を示す唯一の神経ペプチドである。1999 年には、オーファン GPCR のひとつ、SLC-1 が MCH 受容体 (MCH1R) そのものであることが判明した。MCH1R ロックアウトマウス及び選択的アンタゴニストの結果から、MCH 受容体は現在最も有望な抗肥満薬のターゲット分子である。MCH1R はペプチド受容体としては例外的に非常に多くの中枢領域に発現しているため、すべての領域における G シグナリングが同一とは考えにくく、「ある脳領域独自の G シグナリング情報伝達分子」の存在が仮定できる。つまり MCH 受容体はシグナルの多様性を探索するための非常に適したシステムである。

【これまでの研究成果】

斎藤は 1999 年に MCH 受容体 MCH1R を同定した。MCH1R の脳における局在解析・構造活性相関も精力的に行ない、その過程で多くの機能アッセイ系を確立した。即ち、受容体 N 末端・C 末端・細胞内ループの 50 以上にも及ぶ機能変異体を作成・解析し、更に受容体インターナリゼーションにおける C 末端リン酸化部位の役割についても解明した。2004 年末からは構造活性相関の成果を基に GST 融合タンパク質と TOF-MS を用いて受容体結合分子の探索を開始し、受容体機能を修飾する分子を同定した。

【今後の研究計画】

MCH 受容体はペプチド受容体としては例外的に非常に多くの中枢領域に発現しているため、すべての領域における G サイクルが同一とは考えにくい。MCH を経る脳内シグナル伝達分子は様々な G シグナリング経路及びそれに連関するクロストーク系という多彩な経路を持つ可能性が考えられる。しかしその G シグナリング系を修飾・調節する機構についての報告は現在皆無である。そこで申請者の構造活性相関解析で得た豊富な経験を最大限に生かして、MCH を介した G シグナリングについてまず RGS 選択性から検討し、次に選択性決定部位を同定後、該当 RGS に機能的に結合する細胞内因子を同定する。最終的には摂食調節に関連した G シグナリング関連の新規シグナルカスケードを発見・解析すること、さらに G サイクル構成因子を標的とした摂食関連創薬への発展を目標とする。

【背景】

低分子量 G タンパク質 Rheb はタンパク質合成の ON/OFF を決定するスイッチ分子である。Rheb GAP としては既に Tsc2 が知られており、細胞増殖因子刺激によるタンパク質合成シグナルの活性化には Akt/PKB による Tsc2 の不活性化が重要な役割を担っている。その一方、細胞外アミノ酸や糖に応答したタンパク質合成シグナルの活性化は Tsc2 非依存性に起こることが指摘されている。我々は、この Tsc2 非依存性の Rheb 活性化過程において、未同定の Rheb GEF が重要な役割を担っていると考え、その同定を試みた。

【これまでの研究成果】

Rheb は Ras に比較的近縁な分子であることから、機能不明の Ras GEF 分子群のなかに Rheb GEF 活性を有する分子が存在すると考えた。Ras GEF はヒトでは 25 遺伝子、*D. melanogaster* では 8 遺伝子をゲノム上に見いだすことができる。そこで遺伝子の冗長性が少ないと考えられ、かつほぼ完全な遺伝子ノックダウンが行える *D. melanogaster* 培養細胞を用いて Ras GEF 分子群をノックダウンし、タンパク質合成シグナル活性化 (S6K リン酸化を指標とした) への影響を検討した。その結果 3 つの Ras GEF 分子のノックダウンがアミノ酸応答性の S6K リン酸化を顕著に減弱させることが明らかになった。次に、これらの Ras GEF 分子群のヒトオルソログのノックダウンを試みたところ、これら (6 つのオルソログ) のうち 2 つに関して、そのノックダウンが HeLa 細胞においてアミノ酸応答性の S6K リン酸化を抑制することを見いだした。

【今後の研究計画】

今後は、以下の点を中心に解析を進めていく。

Rheb GEF としての同定：リコンビナントタンパク質を用いた再構成系において我々が単離した GEF 候補分子の Rheb GEF 活性を評価する。さらに、他の低分子量 G タンパク質 (Ras、Rho、Rac など) に対する GEF 活性も解析し、その特異性を検討する。並行して、本分子のノックダウンが細胞内における Rheb 活性化 (GTP 結合型への変換) におよぼす影響を解析する。

Rheb GEF/Rheb の活性化機構解析：

我々はアミノ酸応答性の S6K リン酸化にイノシトールリン脂質群および PDK1、PKC・が関与することを見いだしている。そこで、Rheb GEF 活性化に至るシグナル経路を解析するため、これらの分子群 (あるいはイノシトールリン脂質代謝酵素群) の不活性化が各シグナル分子の動態におよぼす影響を解析し、各シグナル分子の相関性を決定する。さらに、上記シグナルカスケードの最終アウトプット分子による Rheb GEF 活性化機構を検討し、細胞外刺激から Rheb 活性化に至るシグナルネットワークの記述を試みる。

M-Ras とその標的蛋白質 DA-Raf による筋形成の制御

千葉大学理学部大学院自然科学研究科

遠藤 剛, 横山隆志, 渡邊晴子, 高野和儀, 堅田史子, 尾熊 整

【背景】

私たちはこれまでに低分子量 G 蛋白質 M-Ras, RhoD (RhoM), RhoT, および M-Ras の標的蛋白質 DA-Raf を同定してきた。これらのうち M-Ras は PC12 細胞において ERK の持続的な活性化を引き起こすことにより, NGF による神経細胞分化誘導に不可欠な働きをしていることを最近明らかにした。また DA-Raf は A-Raf のキナーゼドメインを欠損したスプライシングアイソフォームである。DA-Raf は M-Ras および Ras に結合し, 下流の ERK カスケードに拮抗的に作用することにより, 細胞の増殖を阻害することをこれまでに明らかにしている。今回は特に, M-Ras と DA-Raf による, 骨格筋細胞分化をはじめとする筋形成の制御とその分子機構について報告する。

【これまでの研究成果】

マウス骨格筋 C2C12 細胞の *Mras* 安定トランスフェクタント C2Mras を複数作成した。これらの細胞では筋細胞分化が阻害され, 骨細胞や脂肪細胞への分化転換が容易に起こった。C2Mras では間葉系幹細胞マーカーの Sca-1 と CD34 の発現が誘導されており, 一方, 骨格筋細胞への決定にかかわる Pax7 の発現が消失していた。したがって M-Ras は骨格筋細胞をその前段階の間葉系幹細胞の状態にすることにより, 骨細胞や脂肪細胞への分化転換を引き起こし, 筋細胞分化を阻害するものと考えられる。

v-*Kras* でトランスフォームした NIH3T3 線維芽細胞株 NRT9 の *DAraf* 安定トランスフェクタント NRT/DR を複数作成した。これらの細胞では v-K-Ras によるトランスフォーメーションの形質, および移植したヌードマウスにおける腫瘍形成能が抑制された。したがって過剰発現させた DA-Raf は Ras による癌化に対し抑制作用を表すことが明らかになった。Ras ERK カスケードは筋細胞分化に抑制的に働いているが, C2C12 細胞の分化の過程で, DA-Raf の発現量が著しく誘導された。また *DAraf* をトランスフェクトした C2C12 細胞では, 筋細胞分化が促進された。それに対し, RNAi により DA-Raf をノックダウンした C2C12 細胞では, 筋細胞分化が阻害された。これらの結果から, DA-Raf はその生理的機能の一つとして, 筋細胞分化の誘導を行っていることが示された。

【今後の研究計画】

- (1) M-Ras が幹細胞マーカーの発現を引き起こし, 幹細胞化を誘導する機構を解明する。
- (2) DA-Raf が C2C12 細胞の筋細胞分化だけでなく, 発生過程の筋形成や筋再生過程での衛星細胞の分化誘導にも関与していることを明らかにする。
- (3) RhoD のアゴニストを同定し, RhoD による独自の細胞突起形成の生理的役割を解明する。
- (4) RhoT および Tc10 による骨格筋細胞極性と筋原線維形成の制御を明らかにする。

新規 ARF GAP ファミリー遺伝子 SMAP1, 2 の発見と解析

奈良女子大学大学院・人間文化研究科
渡邊 利雄

【背景】

ARF (ADP ribosylation factor)は Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G 蛋白質でヒトでは 6 種類存在し、同じファミリーに属する Rab ファミリー遺伝子などと協調して働き、小胞を被覆する蛋白質の呼び込みやリン脂質キナーゼの PIP5K の活性制御を介し、細胞の恒常性維持と応答に不可欠な細胞内小胞輸送と細胞膜の構造、及び細胞の骨格を制御している。ヒト、マウス ARF の G サイクルを担う GTPase 活性は、GTP 型へ変換させる ARF GEF (Guanine nucleotide exchanging factor) と、16 種類存在する ARF GAP (GTPase activating protein)により制御されていると推定されている。しかし、制御の特異性、関与する因子群など ARF G サイクルの時空間的制御機構は細胞レベルでも未解析の部分が多く、ARF と ARF GEF, ARF GAP の個体での生理機能はほとんど分かってはいない。

【これまでの研究成果】

我々がその個体での機能を明らかにした造血幹細胞発生に不可欠な白血病関連遺伝子の AML1/Runx1 は転写因子である。この Runx1 の標的遺伝子を探る過程で、最近我々が同定した新規 ARF GAP の SMAP1 とそのホモログとして見つけた SMAP2 は、これまで報告されている ARF GAP とは蛋白質レベルでの相同性が低く、小胞を被覆するクラスリンと直接結合する点でユニークな存在である。培養細胞を用いた解析から、SMAP1 は ARF6 とクラスリンに依存した細胞外から細胞内への輸送を担うエンドサイトーシスを制御することを明らかにした (Mol. Biol. Cell, 2005)。SMAP2 は細胞内で働き、エンドソームと TGN との間の小胞輸送を制御していることを明らかにした (Mol. Biol. Cell, 2006)。さらに最近作製した KO マウスの予備的な解析から、SMAP1 ヘテロ欠損マウスは着床直後に死亡し、SMAP2 ホモ欠損マウスはオスが不妊で、ヒト男性不妊に見られる円頭精子症と同じ精子の形をしていることが判明している。

【今後の研究計画】

KO マウス作製により生理的に重要なことが判明しつつある新規 ARF GAP の SMAP ファミリーによる ARF の G サイクル制御機構の分子基盤と SMAP の生理的役割とを明らかにすることを中心に解析を進めて行きたい。このために、(1) SMAP と相互作用する因子の検索から時間・空間的に制御する機構の解明、(2) SMAP が係わる輸送系で運ばれ、重要な生物学的現象に関与する因子との関係を解析する、(3) 作製した KO マウスを材料として SMAP の個体レベル、細胞レベルでの生理的な役割の詳細な解明、および詳しく、より生体に近い環境での解析用に KO マウスから、異常が見られた組織からの培養細胞株の樹立を試みる。

【背景】

ポリグルタミン病は原因遺伝子の同定により新たに提唱された疾患群で、原因遺伝子の翻訳領域内にあるポリグルタミンをコードする CAG リピートが、患者において特異的に伸張していることが明らかにされた疾患群である。現在、ポリグルタミン鎖 (PolyQ) をもつ変性蛋白質が神経細胞内に核内封入体を形成して、神経細胞に対して障害性を引き起こすことが疾患発症機構に密接に関与していると考えられているが、ポリグルタミン変性蛋白質がどのようなメカニズムで核内に移行するのか全く不明である。私達は神経回路網形成過程を制御する分子群の探索過程において、新規の GTP 結合蛋白質 CRAG を同定した。CRAG が神経発生のみならずポリグルタミン病にも関与することが示唆された。

【これまでの研究成果】

私達は神経回路形成を制御する反発因子セマフォリンのシグナル伝達機構に関与する CRAM (CRMP-5) の機能を中心に解析を行ってきた。この CRAM 結合蛋白質の一つとして GTPase 蛋白質 CRAG (CRAM-Associated GTPase) を同定した。CRAG は Ras 相同性の GTPase 活性配列と N 末端側に Q-rich 領域、そして C 末端側に核移行シグナル配列を有し、主に神経組織に発現する。CRAG はセマフォリンや紫外線などの活性酸素種 (ROS) を発生するストレス刺激により活性化して速やかに核移行し、ユビキチンを伴う核内封入体を形成した。核内において CRAG は PML と相互作用して PML body のドーナツ様形態変化を誘導することが示された。この CRAG の核内封入体がポリグルタミン病の病理所見に類似性を示したことより、マシャドジャゼフ病患者脳における CRAG の局在を調べた結果、患者脳に特異的な CRAG の核内封入体が検出された。そこで、CRAG と PolyQ の核移行との関連性について詳細に検討した結果、CRAG が PolyQ と特異的に結合して核移行し、PolyQ と PML body との共局在を誘導し、PML body において PolyQ の速やかな消失が観察された。これらの結果により CRAG がポリグルタミン病の発症を制御する役割をもっていると考えられた。

【今後の研究計画】

CRAG はストレス応答、とくに ROS を介するシグナル伝達において核ドメインの動態制御に関与していると推測されるので、その分子メカニズムを解明し、神経軸索ガイダンスの分子機構にも応用していきたい。とくに、ROS による CRAG の活性化機構や CRAG による PML body での転写調節機構などの解析を予定している。さらに、CRAG をポリグルタミン病モデルマウスに遺伝子導入し、症状が改善されるかどうかを解析し、CRAG を標的としたポリグルタミン病治療に向けての臨床応用についても検討したい。

アティピカル低分子量 G 蛋白質群の同定と機能解析

東京大学大学院薬学系研究科・生理化学教室
紺谷 園二、梶保博昭、福山征光、堅田利明

【背景】

低分子量 G 蛋白質は現在までに大別して Ras, Rho/Rac, Rab, Arf, Ran の各サブファミリーが同定されており、これらは細胞の増殖・分化や骨格系制御及び細胞内小胞輸送などの多様な生体反応において重要な制御を担っている。しかしながら、既存のサブファミリーには属さない機能未知の G 蛋白質も数多く残されており、ゲノムプロジェクトの成果を活用してユニークな新奇 G 蛋白質を単離・同定してその機能を解析することは、新しいシグナル伝達系の解明、さらには G 蛋白質の普遍性と多様性の理解に貢献すると考えられる。本研究では、一次構造や生化学的性状、また組織分布・細胞内局在の視点からアティピカルな低分子量 G 蛋白質に着目し、それらが介在する生体制御機構を明らかにすることを目的とする。

【これまでの研究成果】

(1) 我々が同定した Di-Ras (Distinct subgroup of Ras-family GTPase) は一次構造上 Ras ファミリーに分類されているものの、既存の Ras ファミリー分子とは異なるサブファミリーを形成している。Di-Ras は線虫以上の多細胞生物に保存され、その発現は神経細胞特異的であり、細胞内で主に GTP 結合型で存在するというユニークな特性を示す。Di-Ras を神経系の培養細胞に過剰発現すると、カスパーゼ経路の活性化を伴うアポトーシスが観察され、このアポトーシス誘導は神経系の細胞に特異的であった。これまでの解析から Di-Ras は、Ras の代表的な活性化経路である Raf-MAPK 系経路には介在しないと考えられ、Di-Ras は何らかの新しい伝達系を介して神経細胞の生存に関与している可能性が示唆された。

(2) Di-Ras と同様にゲノムデータベース検索により見出した Gie/Arf18 は Arf ファミリーに分類される低分子量 G 蛋白質である。一般的に Arf ファミリー分子では N 末端のグリシン残基のミリストイル化修飾が機能発現に重要であるが、興味深いことに Gie にはその脂質修飾を受けるべきグリシン残基が存在しない。Gie は多細胞生物種間で極めて保存性が高く、ヒトでは幅広い臓器に発現している。線虫での RNAi の表現型は胚性致死であることから、Gie は何らかの基本的な細胞機能に関与すると想定される。これまでに Gie が正常な染色体分離に重要であることを報告してきたが、最近の解析から間期における Gie は小胞状構造に局在化しダイナミックに動的変化することが明らかとなった。細胞分裂を行わない神経細胞などにも Gie は多く存在することを考えると、Gie は何らかの膜輸送に関与していることが考えられる。

【今後の研究計画】

Di-Ras および Gie のエフェクター分子や活性制御因子の同定がそれらの機能解明の手掛かりになると考えられる。またこれまでの生化学的・細胞生物学的解析に加え、線虫を用いた遺伝学的解析も行っていく予定である。

個体レベルにおける低分子量G蛋白質 ARF6 の生理機能解析

筑波大学大学院人間総合科学研究科・基礎医学系
金保安則、鈴木輝彦、横関健昭

【背景】

低分子量G蛋白質のADPリボシル化因子(ARF)はARF1-6の6種類のアイソフォームが存在する。これのうちARF6は、細胞膜エンドサイトーシスやアクチン細胞骨格の再構築を制御したり、シグナル伝達因子であるホスホリパーゼDやPIP5-キナーゼなどのリン脂質代謝酵素の活性化因子として機能するなど、多彩な機能を有する低分子量G蛋白質である。ARF6のこれらの機能は細胞レベルで解析されたものであり、個体レベルでのARF6の生理機能については全く報告されていない。そこで我々は、*ARF6* 遺伝子ノックアウトマウスの作製とその解析を行い、ARF6の生理機能の解明を目指した。

【これまでの研究成果】

ARF6^{-/-}マウスは、妊娠中期で胎生致死であった。興味深いことに、*ARF6*^{-/-}胎児の肝臓は野生型胎児と比較すると非常に小さく、その組織染色像はスポンジ様構造を呈していた。また、*ARF6*^{-/-}胎児の肝臓においては、アポトーシスが著しく亢進していた。さらに、*ARF6*^{-/-}胎児においては肝細胞索形成の異常が認められ、この異常は肝臓細胞のアポトーシスの亢進に先行していた。これらの知見から、ARF6は肝細胞索形成において重要な役割を担っていることが示唆された。ARF6の肝細胞索形成への関与は、*in vivo*においても検証された。すなわち、コラーゲンゲル中で培養した*ARF6*^{-/-}胎児由来の肝細胞においてはHGF依存的な索様構造の形成は阻害され、この肝細胞に野生型ARF6を強制発現させるとHGF依存的な索様構造の形成は回復した。

これらの知見から、ARF6は肝細胞索形成に重要な役割を果たしており、*ARF6*^{-/-}胎児においては肝細胞索形成異常に起因した肝臓内の微小環境の異常が肝臓細胞のアポトーシスを引き起こし、その結果、肝臓発生に障害が生じるものと結論づけられる。

【今後の研究計画】

今後は、以下の点を中心に解析を進めていく。

1. 肝細胞索形成シグナル伝達系におけるARF6の下流分子の検索

ARF6はシグナル伝達分子のホスホリパーゼDやPIP5-キナーゼの活性化因子として機能することが知られているので、肝細胞索形成シグナル伝達系においてこれらの分子がARF6の下流で機能するか否かについて解析する。

2. 個体レベルでの脳高次機能構築におけるARF6の役割についての解析

我々は、細胞レベルでARF6がスパイン形態を制御することを見出しており、このことから、ARF6が脳高次機能構築において重要な役割を果たしていることが推察される。この点を解析するため、脳特異的*ARF6*遺伝子欠損マウスを作製し、それを解析する予定である。

錐体視細胞におけるトランスデュースンの活性化と不活性化

大阪大学大学院生命機能研究科
河村 悟、橋木修志

【背景】

我々の網膜中には2種類の視細胞があり、桿体が薄明視に、また、錐体が昼間視に与っている。桿体は光感度が高く、錐体では感度が低い、また、光を検出したときの応答は、桿体では光のオン・オフに追従できないのに対して、錐体の応答は、比較的良く追従できる。

私たちは桿体と錐体とで光応答の示す性質が異なる分子的な理由に興味を持って研究している。光応答を発生するためのメカニズム(視細胞電位発生機構)は桿体と錐体とで共通しているが、電位発生機構を構成している蛋白質が桿体と錐体とで異なっている。このことから、桿体と錐体とで光応答の性質が異なるのは、桿体型と錐体型とで、電位発生機構内での反応の効率や時間経過が異なっているからだろうと推測することが出来る。私たちはどの反応がどの様に異なっているのかを明らかにしたいと考えて研究を進めており、視細胞の三量体G蛋白質であるトランスデュースンに焦点をあてた研究を行っている。

【これまでの研究成果】

桿体型での電位発生機構は、定量的な解析が進んでいる。一方、錐体型では、生化学的実験を行うだけ充分量の錐体を精製することが出来なかったため、研究は殆ど行われていない。錐体の精製が出来なかった理由は、元々殆どの動物において、網膜中には圧倒的に多数の桿体が存在し、錐体の数が少ないことと、両者を区分する方法が見つかっていなかったからである。そこで私たちは、まず、大量の錐体を精製することを計画した。それまでの経験から、コイの錐体は桿体に比べて比重が高いことに気づいていたので比重の違いを利用して両者を区分することを試みた。幸いに錐体を単独に精製することが出来たので、桿体と錐体のトランスデュースンについての研究を行った。これまでの研究によって、1) 光照射後のGTP γ Sの結合を目安にした測定から、活性化された視物質によるトランスデュースンの活性化は、錐体の方が効率が悪いこと(Tachibanaki et al., PNAS, 98:14044, 2001) 2) single turnover assay法により、GTP加水分解反応は、錐体の方が十数倍早いこと(未発表)などを明らかにしてきた。これらは錐体が示す光応答の性質をうまく説明できる結果である。

【今後の研究計画】

これまでの研究成果で示したように、活性化視物質によるトランスデュースンの活性化は錐体の方が効率が低い。これは錐体の視物質側に理由があるのか、それとも錐体のトランスデュースン側に理由があるのかを明らかにする。もし錐体視物質に理由があっても効率が低いのであって、桿体視物質を使えば錐体トランスデュースンの活性化効率が上がるようであれば面白いと考えている。また、トランスデュースンの活性化が桿体と錐体とでどの様に異なるのか、標的蛋白質であるcGMPホスホジエステラーゼに対する作用を目安に検討する予定である。

ロイコトリエン B4 第一受容体 BLT1 の分子解剖

九州大学大学院医学研究院・医化学分野
横溝岳彦

【背景】

我々はこれまでに生理活性脂質をリガンドとする様々なGタンパク質共役型の受容体を同定し、それらを欠損するマウスの作成と表現型解析を通じて、生理活性脂質の生体内での役割の解明を行ってきた。その過程で同定したロイコトリエン B4 第一受容体(BLT1)は、1)様々な細胞において容易に細胞膜に発現させることが可能であること、2)Gi と Gq ファミリーのGタンパク質の両者を活性化しうること、3)放射標識、非標識リガンドの入手が可能であり、結合実験が高感度に行えること、などの特徴を有し、生化学的な解析に適した受容体であると考えられた。そこで、BLT1 受容体を材料にして、受容体の構造と、三量体Gタンパク質の活性化とシグナル伝達の間を明らかにしていきたい。また、BLT1 を材料にして、GPCR の活性化を可視化するプロジェクトの予備的検討を行いたいと考えている。

【これまでの研究成果】

ウシロドプシンの結晶解析の結果、細胞内に第8ヘリックスとも呼ぶべき新たなヘリックスの構造が存在することがわかった。BLT1 においても同様の構造の存在が示唆されたため、このヘリックスの機能解析を目的として、1)ヘリックス8を欠損する変異BLT1、2)ヘリックス8のうち、細胞膜側に存在する疎水性アミノ酸を変異させた変異BLT1を複数作成して、リガンド結合、細胞内情報伝達への影響を観察した。ヘリックス8を欠損、あるいは変異させたBLT1は、野生型BLT1に比べて、約5-20倍のリガンド結合、遷延した細胞内情報伝達、GTP Sへの感受性の低下、が観察され、受容体活性化後の受容体の低親和性への変化に必要なドメインであることがわかった。

【今後の研究計画】

今後は、以下の点を中心に解析を進めていく。

- ・BLT1の結晶化を目標に、大量発現系の構築と精製を進める。
- ・BLT1の細胞内ループのうち、Gi、G16の活性化に必要なドメインを同定する。
- ・BLT1を用いて、GPCR活性化可視化に向けた予備実験を開始する。

【背景】

G蛋白質の活性化・不活性化のサイクルは、グアニンヌクレオチドの結合の有無を指標にすると3状態間の構造転換過程として表せる。つまり、「状態：GDP結合型G蛋白質」、「状態：ヌクレオチド非結合型G蛋白質」、「状態：GTP結合型G蛋白質」である。これらの状態のうち、受容体と結合したG蛋白質はGDPをすでに遊離したの状態である。受容体などの活性化因子とG蛋白質サブタイプとの選択特異性は状態からへの変換過程で決定され、一方、状態からへの過程ではG蛋白質の活性化効率が決定されると考えられる。生化学的にはGTP (GTP・S) binding 活性を測定することが多いが、この測定では両方の過程をあわせて測定していることになる。つまり、受容体と結合するG蛋白質の選択特異性を決定するにはこれら2つの過程を分離して測定することが望ましい。しかし、実験上の困難から直接測定したという報告はこれまでにはない。

【これまでの研究成果】

我々は、ロドプシンを実験材料とすると、G蛋白質の活性化機構を時間分解能の高い分光学的手法を用いて観測することに着目し、これまでロドプシンとG蛋白質との結合過程を詳細に検討してきた。その結果、従来ロドプシンのG蛋白質活性化中間体と考えられてきたメタ 中間体の前に新たにG蛋白質と相互作用する中間体(メタ Ib)を発見した。また、この中間体はGDP結合型のG蛋白質と複合体を形成していることを明らかにした。つまり、上記のGサイクルのうち、状態 と の過程に生成する中間体を初めて観測することに成功した。

【今後の研究計画】

今後は、以下の点を中心に解析を進めていく。

G蛋白質と受容体とのイニシャルコンタクト(状態 I)において、G蛋白質サブタイプの選別が行われているかを検討する。具体的には、

1. G蛋白質のC末端アミノ酸配列が各種のG蛋白質サブタイプの配列になったGi サブユニットの変異体を発現させる。また、各サブタイプのC末端アミノ酸配列のペプチドを合成する。次に、ロドプシンをこれらのG蛋白質あるいはペプチド共存下で光照射し、その後に生成するメタ Ib 中間体の挙動を観測し、メタ Ib 中間体の挙動の変化を誘起するG蛋白質変異体あるいはペプチドが存在するかを検討する。
2. ウシロドプシンの細胞質第3ループをGo 共役型ロドプシンの細胞質第3ループに置換すると、ウシロドプシンのGt 型G蛋白質共役特異性がGo 型に変換する。そこで、この変異体を用いて1と同様の実験を行い、生成するメタ Ib 中間体の挙動を観測する。

【背景】

低分子量 G 蛋白質の活性化は GDP-GTP 交換反応を促進する GTP 交換促進因子 (GEF) が必須で、多数の分子が同定されている。我々は、酸化 LDL の構成成分であるリゾホスファチジルコリン (LPC) で誘発される非選択性陽イオン電流におよぼす高コレステロール治療薬の HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン類) の作用を検討する過程で、低分子量 G 蛋白質 Rho の活性化が 3 量体 G 蛋白質 Gi/o により媒介され、その活性化にはイソプレニル転移酵素 (我々の場合はゲラニルゲラニル転移酵素: GGTase1) の活性化が関与するというユニークな結論に達した。3 量体 G 蛋白質を介する Rho の活性化は $G_{12/13}$ から p115RhoGEF を介する系がよく研究されているが、Gi/o に媒介される経路は明らかでない。

【これまでの研究成果】

LPC はモルモット単離心筋細胞および血管内皮細胞において非選択的陽イオンチャネルを開口し細胞外 Ca^{2+} の流入を促進した。この LPC の作用はスタチンの短時間処理により抑制され、そのメカニズムの解析から以下のような重要な知見を得た。LPC の作用は百日咳毒素処理により消失し、Gi/o を介した作用であった。LPC の反応は細胞内の GGPP に依存していた。LPC の反応は Rho を阻害する C3 毒素で抑制された。以上のことから、Gi/o からのシグナルは GGPP に依存して Rho を活性化し、その過程には GGTase の活性化が介在すると考えられた。実際に、血管内皮細胞では Gi/o からのシグナルが GGTase 活性を上昇させ、この活性化により細胞質の非イソプレニル化 Rho が新たにゲラニルゲラニル化され細胞膜に移行することを示した。以上の結果より、Gi/o から何らかの形で GGTase 活性を調節する情報が流れていると考えられた。また、スタチンの短時間作用の結果から、細胞内メバロン酸代謝物の濃度はスタチン処理後速やかに減少することが考えられた。

【今後の研究計画】

今後は Gi/o からどのように GGTase1 活性化に情報が伝わるのか、ゲラニルゲラニル化に必要な細胞内のメバロン酸代謝物、特にゲラニルゲラニルピロリン酸やファルネシルピロリン酸の細胞内濃度がスタチン類でどのような経時変化を示すか、ゲラニルゲラニル化された Rho の活性化にどのような GEF が関与するか、そして、この情報伝達経路がどの程度普遍的なものを検討し、これまで知られていなかった Rho 活性化メカニズムを明らかにしていきたい。

【背景と目的】

RGS タンパクファミリーは、G の GAP 能をもつ G 蛋白質共役受容体系の一群の調節因子である。そのうち、この最もプロトタイプ的なサブファミリーが、B/R4 である。近年、この G 蛋白質制御因子の一種である B/R4 が、実は特定の受容体系を選択して作用することが知られるようになってきた。そこで、その受容体選択性の機構にアプローチする研究が行われ、海外のグループが RGS2 を用いて、また我々は、RGS8 でムスカリン m1 受容体等の特定の受容体の第 3 細胞内ループに B/R4 が直接結合することを報告した。即ち、B/R4 による受容体選択的な G タンパク制御の機構の一つが、B/R4RGS と特定の受容体の選択的 direct 結合であることが確立されてきた。一方、直接結合出来ない受容体のシグナル系は、B/R4 はすべて調節できないのだろうか。この点に関して、最近重要な知見が報告された。即ち、足場タンパクである spinophilin が、幾つかの B/R4 を結合することが報告されたのである。さらに spinophilin は、幾つかの受容体に優先的に結合する足場タンパクとしても知られていた。これらのことから「足場タンパクを介した特定の受容体へのリクルートが、B/R4 のもう一つの受容体選択性のメカニズムである」と予想される。そこで、本研究では、この点にアプローチする研究を進めていく。

【これまでの研究成果】

(1) RGS 8 及び各 B/R4 と spinophilin の結合性：spinophilin cDNA を入手し、これを MBP 融合蛋白質発現ベクター、GST 融合蛋白質発現ベクターに組み込んで、融合蛋白質を調製した。この組換え蛋白質を用いて、RGS 8、RGS 8 S、RGS 4、RGS 2 が spinophilin 結合性を持つかどうか、プルダウン実験で検討中である。

(2) 新規 B/R4 結合性足場タンパクの同定：B/R4 に結合する新規足場タンパクを見つけ出していくため、RGS 8 をバイトにイースト Two-hybrid スクリーニングを行った。RGS 8 の発現組織である小脳のライブラリーを用いて行った結果、24 個の陽性クローンが同定された。現在、各クローンの配列決定と RGS 8 との結合性について解析を進めているが、陽性クローン中に、spinophilin が見出された。

【今後の研究計画】

前述の 1 の解析を進め、更に spinophilin 結合性受容体を同定する。そして、その受容体を用いて、B/R4 の GPCR 制御能が、spinophilin の発現に伴ってどう変化するか、生理機能解析を行う。前述 2 の解析を進め、同様の生理機能解析を行っていく。これらのことによって、足場タンパクを介した受容体選択性の決定機構を明らかにする。

G 蛋白質相互作用解析技術の開発

筑波大学大学院人間総合科学研究科・薬理
三輪佳宏

【背景】

G 蛋白質を中心とする G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) やエフェクターとのタンパク質間相互作用ネットワークを解明することは、G 蛋白質の制御機構や生理機能を明らかにする上で重要である。しかしながら細胞膜系で起こる現象であるために、yeast two hybrid などの一般的な相互作用解析手法の適用が困難であり、効率的な解析のためには新たな手法の開発が必要とされている。それに加えて、遺伝子導入して発現させた GPCR が細胞表面に輸送されず途中で止まってしまうケースもあり、オープン受容体の生理的リガンドを検索する上での障害となっているため、GPCR 細胞内輸送を担うタンパク質ネットワークを明らかにすることも極めて重要である。

【これまでの研究成果】

われわれは、『生きたままの細胞中の分子を見る』技術を開発することで、時間経過にともなう変化をリアルタイムに追跡可能にし、その分子の役割を解明できるようにすることを目的に研究を進めている。これまでに、「通常の状態ではユビキチン-プロテアソーム系によって分解されてしまうが、他の分子と相互作用することによって分解を免れ、安定に細胞内に蓄積する」という性質を獲得させた変異体タンパク質を開発することで、生きたままの哺乳動物細胞中の分子間相互作用を蛍光として検出可能にするデグラトンプローブと名付けた新技術の開発を進めてきた。とくに、生細胞中でのタンパク質間相互作用を可視化する RUBY システムやその応用法を開発してきている。

【今後の研究計画】

今後は、RUBY システムを用いた生細胞内タンパク質相互作用の検出法を、G タンパク質のネットワーク解析に応用することを目指して、以下の点を中心に解析を進める。
1) GPCR・G 蛋白質間相互作用の検出、2) G 蛋白質・エフェクター間相互作用の検出、
3) タンパク質複合体の相互作用安定性を蛍光の色調変化としてイメージングする実験系の開発。

またこれとは別に、細胞内での分子間相互作用の履歴をメモリーして、後から纏めて解析できるような、新しい実験手法も開発中である。これを G タンパク質の分子間相互作用検出に応用することを目指して、開発を進めている。

新規接着分子ネクチンによる細胞間接着形成における低分子量 G タンパク質の役割

大阪大学大学院医学系研究科・分子生物学
扇田久和

【背景】

ネクチンは細胞外領域に免疫グロブリン様ループを有する接着分子で、細胞間接着部位のアドヘレンスジャンクション(AJ)に局在し、AJ に存在する別の主要な細胞間接着分子カドヘリンと共に細胞間接着の形成において重要な役割を果たしている。これまでに、細胞間接着が形成される過程において、まず最初に、ネクチンどうしの結合が生じ、その結合部位にカドヘリンがリクルートされて、最終的に AJ が形成されることが見出されている。

【これまでの研究成果】

カドヘリンがネクチンの結合部位にリクルートされる分子メカニズムとして、低分子量 G タンパク質 Rap1、Cdc42、Rac が関与していることが明らかとなった。まず、ネクチンどうしの結合により c-Src が活性化され、活性化された c-Src は、一方では、Cdc42、Rac に対する GDP/GTP 交換因子 FRG、Vav2 をそれぞれチロシンリン酸化し、他方では、Crk、C3G を介して Rap1 を活性化した。活性化された Rap1 はリン酸化された FRG、Vav2 を最終的に活性化することにより、Cdc42、Rac を活性化した。これらの活性化された Cdc42、Rac はアクチン細胞骨格の再編成を介してカドヘリンをネクチン結合部位にリクルートするのに作用するとともに、細胞辺縁部ではフィロポディアやラメリポディアの形成を増加させて、細胞間接着の形成を促進した。これらの結果から、ネクチンによる Rap1、Cdc42、Rac の活性化は、カドヘリンによる AJ の形成において重要であると考えられる。

【今後の研究計画】

1. ネクチンによる細胞間接着形成におけるインテグリンの関与：細胞間接着と細胞基質間接着との間にはクロストークが存在することが知られている。しかし、その詳細については不明な点が多く、細胞基質間接着分子インテグリンがネクチンによる低分子量 G タンパク質の活性化を介した細胞間接着の形成・維持において、どのように関与しているかについて検討する。
2. 低分子量 G タンパク質が細胞の極性形成に関わる分子機構：上皮細胞では極性形成により、AJ の頭頂側にタイトジャンクション(TJ)が形成されて細胞間接着が完成するが、どのように TJ が AJ の頭頂側に形成されるかの分子メカニズムについては不明である。そこで今後は、ネクチンによって活性化される低分子量 G タンパク質やアクチン細胞骨格の再編成に焦点をあて、これらが細胞間接着部位での TJ の位置決定に与える効果について検討する。

【背景】

血管内皮細胞に特異的に発現する Vascular Endothelial cadherin (VE-cadherin) はホモフィリックな結合によってアドヘレンス接合を形成する。これまでに我々は、細胞の接着を契機として細胞間接着が強固になる現象、cAMP の増加が血管の透過性を抑制することがいずれも Rap1 によって制御されることを示してきた。つまり Rap1 が細胞の outside-in, inside-out の両方のシグナルにかかわることがわかった。本研究ではさらに、Rap1 がどのように細胞間接着を制御するのかを明らかにしていくことを計画した。

【これまでの研究成果】

(1) cAMP の増加はアクチン細胞骨格による VE-cadherin の裏打ち機構を増強させて細胞間接着を安定化する。

cAMP-Epac (cAMP 依存性 Rap1 活性化因子)-Rap1 によって、細胞 基質接着に局在していた vinculin が細胞 細胞間接着部位へ局在化が亢進した。したがって、細胞間接着部位でのアクチン束化が促進されて、VE-cadherin の細胞間接着部位での裏打ちが増強された。

(2) cAMP の増加は、VE-cadherin の細胞間接着部位への移行を促進させる Forskolin 刺激により細胞間接着は増強し、エンドゾームに蓄積した VE-cadherin が細胞間接着部位に移行するのが観察できた。Rap1 の不活性化により抑制されるので、Rap1 が VE-cadherin の移行を促進していると考えられた。VE-cadherin がどのように輸送機構にはいつていくのかを明らかにするために、各種エンドゾーム、ゴルジマーカー (Rab4, Rab5, Rab7, Arf1, GM130) の局在と VE-cadherin-EGFP 分子の局在を比較した。Rab4, Rab11 との共局在は明瞭に観察され、recycling エンドゾーム機構に従うこと、また Golgi に集積していた VE-cadherin が積極的に輸送されていくことが明らかになった。したがって、Rap1 の活性化により、recycling エンドゾーム・Golgi から VE-cadherin が細胞間接着部位に輸送されていき、接着部位でさらに安定化を受けて VE-cadherin 依存性の接着を強めると考えられた。

【今後の研究計画】

今後は、Rap1 のエンドゾームでの標的分子の同定と如何にして VE-cadherin の輸送を促進させるかを明らかにすること、VE-cadherin だけではなく普遍的に Rap1 が分子の輸送の調節にかかわるかを明らかにしていく。

迅速 Rab-GAP スクリーニング法の開発

東北大学大学院生命科学研究科・生命機能科学専攻
福田光則

【背景】

低分子量 G 蛋白質 Rab はヒトにおいて 60 種類以上もの異なるアイソフォームが存在し、個々の Rab はオルガネラ特異的あるいは細胞種特異的に膜輸送を制御すると考えられている。Rab は GTP と結合している活性化型、GDP と結合している不活性化型の二つのフォームをとり、活性化型の GTP-Rab が特定の標的因子（エフェクター）と結合することで膜輸送を促進する。適切な Rab の不活性化（あるいは GTP-GDP のサイクリング）は Rab の正常な機能発現に不可欠と考えられており、Rab の不活性化酵素として GAP (GTPase-activating protein) の存在が提唱されている。例えば、Rab27A の活性化型固定化変異 (A152P) は色素異常や免疫疾患を伴うヒト遺伝病 Griscelli 症候群を引き起こすことから、Rab27A の正常な機能発現には Rab27A-GAP による不活性化が不可欠と考えられる。しかしながら、Rab27A を含めヒトに数多く存在する Rab のうち特定の GAP が同定されているものはほとんどなく、Rab 不活性化の分子メカニズムは未だ謎に包まれている。

【これまでの研究成果】

本研究では Rab に特異的な不活性化酵素 GAP を迅速にスクリーニングする手法の確立を目指している。具体的には、Rab-GAP ドメインと推測されている TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) ドメインを持つ 40 種類のヒト由来の蛋白質が実際にどの Rab に対する GAP として機能するかを迅速且つ正確に決定する手法を開発する。これまでの準備研究でマウスに存在する 60 種類の Rab 及び 40 種類の TBC 含有蛋白質の cDNA を既にクローニングしており、酵素-基質特異性に基づく物理的な結合を指標として Rab-GAP 候補のスクリーニングを網羅的に行った。酵母 Two-hybrid 法により 2400 種類の組み合わせを全て検討した結果、この手法で同定できる Rab-GAP の数には限りがあり、大部分のものに関しては Rab と TBC 蛋白質の物理的結合と Rab-GAP 活性にはほとんど相関がないことが明らかとなった (Itoh *et al.* (2006) *Genes Cells*, in press)。本研究ではさらに物理的な結合に基づかない新規の Rab-GAP スクリーニング法として、Rab-GAP の機能に基づいたスクリーニング法を開発中である。

【今後の研究計画】

TBC 蛋白質を標的の Rab と同時に細胞内に発現させると、GTPase 活性を促進し（細胞内の GTP-Rab が減少し）Rab の膜輸送における機能を抑制すると考えられる。もし 40 種類の TBC 蛋白質の中に Rab27A-GAP が存在すると、この蛋白質のメラノサイトへの発現はメラノソーム上の Rab27A を不活性化し、その輸送を阻害するはずである。今後、この仮説を検証するため 40 種類の TBC 蛋白質を一つずつメラノサイトに導入し、メラノソーム輸送阻害を引き起こすものをスクリーニングする予定である。

神経機能における新規ホスホリパーゼ C と低分子量 G タンパク質の相互作用

東京薬科大学・生命科学部・ゲノム情報学研究室
深見 希代子

【背景】

我々はイノシトールリン脂質代謝の要の酵素であるホスホリパーゼ C (PLC) の生理機能を解析する課程で、新規 PLC である PLCeta2 を見いだした。PLCeta2 は、三量体 G タンパク質で活性が制御される PLC タイプと C 端のアミノ酸が長いなどよく似た構造を持っていたが、ドメイン構造内のアミノ酸の配列はむしろ PLC タイプに近いことから、新たなカテゴリーの PLC であることが判明している。また、PLCeta2 の酵素活性はカルシウムイオンに対して非常に感受性が高いことや、その発現が脳に特異的であり、出生直後からその発現量が急激に増加することから、神経機能への関与が示唆されている。

【これまでの研究成果】

マウスにおいて PLCeta2 は出生後の脳に特異的な発現がみられた。さらに詳細な解析により、PLCeta2 の発現は特に海馬や嗅球に多いことや、神経初代培養細胞を用いた実験により、PLCeta2 が神経細胞に発現していることを見出している。これらの事実は PLCeta2 が記憶のメカニズム、神経回路網の構築に深く関わりを持っていることを示唆している。また、ごく最近になって、PLCeta2 を神経系培養細胞に遺伝子導入して強制発現させると、神経突起の伸長が促されることを観察している。さらに、ほ乳類培養細胞に PLCeta2 を強制発現させると、F-アクチンと共局在を示すことも確認しており、PLCeta2 がアクチン骨格を制御する可能性は高いと考えられる。

【今後の研究計画】

1. 培養細胞を用いた PLCeta2 発現による神経ネットワーク形成の検証

哺乳動物細胞またはマウス/ラット神経初代培養細胞に PLCeta2 をアデノウィルス、レンチウイルス等を用いて強制発現させ、PLCeta2 の神経突起伸長における機能を確認する。逆に PLCeta2 の siRNA を行い、神経突起伸長誘導への影響を観察する。

2. PLCeta2 による神経突起伸長時の Rho ファミリー低分子量タンパク質の関与の検討

神経突起伸長においては、Rho、Rac、Cdc42の活性化状況が重要である。そこで上記培養系において PLCeta2 を過剰発現した際の、活性化型 RhoGTPs (Rho, Rac, cdc42) の量的変化を検討することにより、PLCeta2 と低分子量 G 蛋白質の相関を明らかにする。またこの時の低分子量 G 蛋白質の活性化状態とアクチン骨格、チューブリン骨格との関連性についても検討する。

3. PLCeta2 から Rho ファミリーへのシグナル伝達機構の解明

PLCeta2 と低分子量 G 蛋白質の相関が得られた場合には、PLC の基質 PIP2 をリン酸化し PIP3 を産生する酵素である PI3 キナーゼの活性化、Akt の活性化などを調べることにより、低分子量 G 蛋白質活性化へ至るシグナルの流れを明らかにする。

【背景】

植物は病原体の侵入を認識し、自らもっている様々な抵抗性反応を発動させ、病原体の増殖を防ぐことができる。これまでに、イネの Rac ファミリーの低分子量 G タンパク質 OsRac1 が、病原体認識から抵抗性発現に至る信号伝達系においてキーレギュレーターとして機能していることを明らかにしてきた。しかし、耐病性反応時に Rac を活性化する GDP-GTP 交換因子(GEF)については不明のままである。本研究課題では、耐病性反応に関与する Rac GEF を同定し、その GEF の機能解析を通じて耐病性発現における Rac の活性化機構を明らかにすることを目的とする。

【これまでの研究成果】

昨年、モデル植物であるアラビドプシスより新規な構造を持つ PRONE 型 Rac GEF が単離された。データベース検索により、イネでは 12 種類の PRONE 型 GEF 候補遺伝子が存在していることが明らかになった。これらの遺伝子についてリアルタイム PCR を用いた発現解析を行ったところ、数個の GEF 候補遺伝子が耐病性反応と関連していることが示唆された。12 個の候補遺伝子のうち、9 個について cDNA を単離し、それらが大腸菌でのタンパク質発現用ベクターに組み込んだ。それぞれのタンパク質を精製し、OsRac1 との相互作用をプルダウン法を用いて解析した。その結果、7 個の GEF クローンについて、OsRac1 との相互作用が確認された。また、それぞれの GEF タンパク質は、GTP 型あるいは GDP 型、ヌクレオチドフリーの OsRac1 に対して異なる特異性を示すことが明らかになった。

さらに、PRONE 型以外の GEF を単離するため、GEF に対して高い親和性を示す OsRac1 のドミナント・ネガティブ変異(D125N)を用いて、Two Hybrid スクリーニングを開始した。現在までに、多くのポジティブクローンが得られている。

【今後の研究計画】

今後は、解析を行っていない残りの 3 遺伝子について cDNA を単離し、タンパク質発現用のコンストラクトを作成する予定である。また、すでにタンパク質を調製している 9 種の GEF タンパク質については、OsRac1 に対する GEF 活性を測定し、その特異性を明らかにする。さらに、OsRac1 に対して GEF 活性を示すクロンの過剰発現体を作成し、細胞内での OsRac1 の活性化に与える影響を調べると同時に、耐病性機構との関連性について解析を行っていく予定である。

【背景】

低分子量 G 蛋白質 RAB ファミリーは小胞輸送に関与する重要な分子であるが、その生理的役割は不明なものが多い。現在までに酵母で 11、線虫で 29、ヒトで 60 以上の rab 遺伝子が同定されており、生体の構成や生命活動の複雑さに対応して進化の過程でその数が増加していったと考えられる。線虫はわずか 1,000 細胞から構成される単純な多細胞動物であるが、筋肉系、神経系、消化管系、生殖系など多様な組織から構成されヒトと本質的には共通の生物学的特性を持っている。したがって、線虫をモデル動物として多細胞系における RAB の機能を体系的に理解することはヒト RAB ファミリーの生理作用や疾患メカニズムの解明に向けて極めて重要な意義を持つと考えられる。

【これまでの研究成果】

近年遺伝子機能を抑制する簡便な手法として RNAi 法が開発され、線虫だけではなく培養細胞や多くのモデル生物で多用されている。しかし、RNAi 法は遺伝子によってノックダウン効果が異なる点を常に考慮しつつ表現型解析を行う必要がある。また、トランスジェニックレスキュー実験が理論的に不可能であることから、分子構造と機能相関についての解析には適用できない。このような点から個体レベルでの詳細な機能解析の遺伝的リソースとしてはノックアウト変異体がより有用であると考えられる。そこで我々は体系的なゲノム機能解析を行うため、ノックアウト変異体作成法の効率化とシステム整備を行ってきた。現在線虫ゲノム全遺伝子に対して複数アレル分離可能なゲノム数の mutant bank を保有しており、rab 遺伝子および関連遺伝子群のノックアウト変異体分離について本研究課題の遂行に十分な研究環境が準備されていると考えている。また、特異的な輸送経路を解析するための各種蛍光マーカープラスミドやトランスジェニックラインも作成している。

【今後の研究計画】

生体における RAB ファミリーの作用機構を解析するための遺伝的リソースを作成する。1. ノックアウト変異体の分離：既に作成済みの mutant bank を目的とする遺伝子のプライマーで PCR スクリーニングし、欠失変異を同定する。対応する凍結 mutant bank のシブスクリーニングを行い欠失変異体を分離する。欠失部位はシーケンス解析を行い、遺伝子の発現制御領域やエクソン配列を欠失していることを確認する。2. ノックアウト変異体の維持管理：変異体を野生型線虫と数回交配することで二次的な変異を取り除いた後、変異体の表現型を (A) ホモ接合体で生存維持可能、(B) 不稔、(C) 致死に分類し、(B)(C) に関しては安定に維持するため遺伝的バランスを導入する。さまざまなオルガネラマーカーや蛍光トレーサーの局在を変異体バックグラウンドで観察し、オルガネラの形成・維持や特異的輸送経路における各 rab 遺伝子の生理的役割を明らかにしたいと考えている。

酵母細胞における低分子量G蛋白質の時間、空間的制御機構の解明

理化学研究所・中央研究所・中野生体膜研究室
黒川量雄

【背景】

私は、現在までに哺乳類細胞の系で低分子量G蛋白質(Rhoファミリー、Rasファミリー-G蛋白質)活性のFRETプローブを開発し、G蛋白質の時間・空間的制御機構を明らかにしてきた。分子スイッチであるG蛋白質が細胞機能発現に特異性と多様性をもたらす機構を解明するには、スイッチのオン、オフが細胞内の「いつ、どこで」起きるかを明らかにすることが必要である。本研究では、蛋白質の輸送経路で働く低分子量G蛋白質であるSar/Arfファミリー、Yptファミリー-G蛋白質の時間・空間(3次元)的活性変化を可視化する。系として出芽酵母を用いることで、精度の高い遺伝解析とFRETプローブを用いたG蛋白質活性の時空間情報解析と組み合わせ、各種制御因子や他のG蛋白質との相互作用などによるSar/Arfファミリー、Yptファミリー-G蛋白質の時間・空間制御機構を解明する。

【これまでの研究成果】

Sar/Yptファミリー-G蛋白質の一員であるSar1は小胞体における蛋白質の選択的な輸送である小胞輸送の制御に関わる。出芽酵母は決まった場所から新たな細胞(娘細胞)が形成されてくる出芽と呼ばれる極性をもった増殖過程を取り、このとき小胞体上の蛋白質が娘細胞と母細胞でその拡散が制限される機構がある。そこで、出芽時の母細胞と娘細胞との間でSar1とその制御因子であるSec12のダイナミクスと相互作用の効率とを調べた。可逆的にphoto-activationできる蛍光蛋白質であるDronpaとの融合蛋白質を作成し、Sar1とSec12の母細胞と娘細胞での拡散を調べたところ、Sec12の拡散は各細胞間でほとんど差がないが、Sar1は娘細胞での拡散が著しく遅いことが判明した。一方、Sar1とSec12の相互作用の効率は、母細胞、娘細胞間でほとんど差がなかった。このことからSar1はSec12による活性化の効率は母細胞と娘細胞で差がないが、Sar1のエフェクター蛋白質との相互作用の効率が娘細胞で高いことが考えられる。現在2分子FRETの系でSar1とそのエフェクターとの相互作用の効率を調べている。次にYptファミリーの一員であるYpt31/32はポストゴルジで働く蛋白質であり、GFPYpt31/32の観察により娘細胞の先端に集積することわかった。現在1分子FRETプローブを作成中である。

【今後の研究計画】

今後は、以下の点を中心に解析を進めていく。Sar1の制御因子およびエフェクターとの相互作用が出芽酵母の極性増殖過程において時空間的に制御されていることがわかってきた。そこでこの時空間制御に極性増殖に関与する分子群がどのように作用しているかを解析する。また、CFPとYFPをそれぞれエネルギー供与体、エネルギー受容体とするYpt31/32のFRETプローブを完成させる。

mDia1 による急性アクチン線維生成反応

京都大学医学研究科・神経細胞薬理学
渡邊 直樹・東田 知陽・小林 新吾

【背景】

Rho ファミリー G 蛋白質が主要な役割を果たすアクチン細胞骨格改変シグナルでは、ある因子の変動が他の生化学パラメータを大きく変化させるため、細胞の中での個々の分子メカニズムの働きの正確な把握は難しかった。生細胞内蛍光単分子可視化の手法を用いたわれわれのこれまでの研究により、Rho のエフェクター分子である mDia1 がアクチン線維の反矢じり端に結合しながら、その伸長に伴いプロセスに分子移動することが明らかにされた (*Science* 303, 2007-10, 2004)。この性質は、mDia1 のアクチン重合活性中心である FH1-FH2 ユニット構造や FH2 ドメインからなる部分変異体では、恒常的にみられるものの、全長を含む野生型の分子では、細胞内で直線状の分子移動を起こす頻度はまれで、リコンビナントの Rho を微量注入したときにのみ、その頻度が上昇した。mDia1 では、休止時にその N 末端と C 末端が結合しており、N 末端に Rho が結合すると C 末端の FH1-FH2 ユニートを活性化する、自己抑制的な制御 (*Nature Cell Biol.* 1, 136, 1999) を受けているためと考えられている。

【これまでの研究成果】

野生型の mDia1 の分子挙動を追うことで、Rho-mDia1 シグナルの生理的な意義やその動的な変化を捉えることを目指した。通常の培養条件での XTC 線維芽細胞では、野生型 mDia1 が直線状分子移動する頻度は上述したようにまれであり、Rho-mDia1 のシグナルは活性化の頻度が低いことが考えられる。今回、細胞を物理的に刺激することで、一過性に mDia1 の挙動が変化し、そのシグナルが活性化されることを示唆するデータが得られつつあり、その制御に関連した分子機構について解析を進めている。

【今後の研究計画】

今後、以下の点を中心に解析を進めていく。

- 1) 上記の mDia1 の挙動変化に関連する制御機構の同定を試みる。
- 2) 関連して、Rho や類縁の分子の挙動も比較検討を進める。
- 3) これとは別に、mDia1 に特に発達したフォルミンファミリーがもつアクチン伸長を加速する能力 (mDia1 が最速で、5-15 倍) に関する分子メカニズムについて、種々の変異体の分子イメージングや細胞環境の影響をみることで解明を試みている。

Rho シグナルによるセプチン繊維構造の制御機構

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
永田浩一、伊東秀記

【背景】

セプチンは酵母から哺乳類まで広く保存されている GTP 結合蛋白質群である。細胞内でヘテロ複合体構造を形成し、細胞骨格系と密接に関連しながら細胞周期・細胞極性・細胞内シグナル伝達などを制御すると考えられている。セプチンの生理機能の詳細や構造・機能制御の分子機構には不明な点が多いが、最近、Rho ファミリーのシグナル経路との関連が報告された。

【これまでの研究成果】

我々はこれまでに、細胞骨格関連蛋白質セプチンが、低分子量 G 蛋白質 Rho とその標的蛋白質 Rhotekin による構造制御を受ける可能性を提示してきた。すなわち、Sept9 の機能解析の過程で、Sept9 が Rho 特異的な活性化因子 SA(Septin-associated)-RhoGEF と結合することを見出した。SA-RhoGEF を繊維芽細胞 REF52 に過剰発現させるとセプチン繊維の崩壊が観察されたことから、Rho シグナルがセプチンの構造を制御している可能性が示唆された。そこで、Rho の標的蛋白質のなかでセプチンの繊維構造を崩壊させる分子を探索したところ Rhotekin が同定された。

【今後の研究計画】

今後は、以下の点を中心に解析を進めていく。

- 1) Rho/Rhotekin によるセプチン構造制御機構の解明：Rhotekin はセプチン構造を崩壊させることが明らかになったものの、その詳細な分子機構は不明である。我々は、Rhotekin と結合する複数の蛋白質を同定しているが、それらの蛋白質とセプチンとの機能的関連性は不明なままである。そこで今後は、Rhotekin と相互作用する蛋白質群がセプチン構造に与える影響を詳細に解析する。
- 2) Sept8 の神経細胞における機能解析：我々は種々のセプチンの性状・機能解析を進めている。最近、Sept8 のアイソフォームがラット脳の視索上核と室旁核と呼ばれる領域に非常に強く発現していることを見出した。これらの2つの核からは、下垂体後葉へと軸索が投射しており、バゾプレッシン（血圧上昇作用と抗利尿作用）やオキシトシン（子宮筋収縮作用）が放出されることが知られている。我々は、Sept8 が、神経伝達物質の放出制御に関与する前シナプス蛋白質であるシナプトプレビンと相互作用することも見出しており、Sept8 がバゾプレッシンやオキシトシンの分泌制御に関与している可能性が高いと考えている。そこで、下垂体後葉ホルモンの分泌制御の観点から Sept8 の神経系における機能解析を行う。

【背景】

Ras ファミリーに属する一部の分子 H-Ras, K-Ras では、GTP 結合型 (Ras-GTP) において、シグナル伝達能力を有する “ON” 状態 (state 2) と、有さない “OFF” 状態 (state 1) の 2 種類のコンフォーメーションが混在し、ミリ秒単位の比較的緩やかな速度で相互変換していることが、これまでの ^{31}P -NMR 解析で明らかになっている。H-Ras-GTP では、Raf, RaIGDS 等の標的を加えると、(化学シフトの結果から) 2 つの state の相互変換が state 2 の側に遷移することから、state 2 が標的を認識・結合するコンフォーメーションと考えられている。State 2 の高次構造及び機能解析は、これまで進んできているが、state 1 のシグナル伝達系における意義については全く未解明である。本研究では、種々の低分子量 G 蛋白質の state と state 遷移のメカニズムを解析するとともに、シグナル伝達における意義を解明する。

【これまでの研究成果】

Ras ホモログである M-Ras は、H-Ras と多くの標的を共有するが、標的との affinity はいずれも低い。我々の研究で M-Ras は、GTP 結合型において state 1 のコンフォーメーションを優位 (90%以上) にとることが明らかになった (J Biol Chem. 2005; 280 (35): 31267-75.)。標的として Raf-1 を加えたところ、state 1 から state 2 への遷移が認められた。これらの結果から、M-Ras は state 1 優位であるために、標的と結合するには state 1 から state 2 への遷移が必須であり、その際エネルギー的 (時間的) コストを要する結果、標的に対する affinity が低くなると考えられた。また X 線結晶構造解析で得られた M-Ras-GTP の state 1 構造表面には、Ras では初めてのとなるポケット構造が確認された。現在、このポケットに結合し Ras のシグナル伝達を抑制する低分子化合物の *in silico* スクリーニングを行っている。

約 8~10 アミノ酸からなる Ras の switch I は、標的との結合上最も重要な領域であると同時に Ras ファミリーでは極めて保存性が高い。また、M-Ras は H-Ras と全く同一の switch I のアミノ酸配列を有する。State 1 から state 2 のコンフォーメーション変化のメカニズムを明らかにするために、M-Ras の switch I 周辺の 3 つの残基について H-Ras 型に置換を行い、 ^{31}P -NMR 測定を行ったところ、state 2 のシグナルが優位に増加した。得られた結果は、これらの残基がコンフォーメーション変化に重要な役割を果たすことを示していた。

H-Ras-GTP では state 1 と state 2 の割合は約 4:6 である。Rap1A-GTP の ^{31}P -NMR 測定を行ったところ、state 2 と考えられるシグナルがほぼ 10 割の割合で観察された。Rap1A に標的である RaIGDS を加えたところ、state 2 から state 1 への遷移が認められた。この遷移は、H-Ras のそれとは全く逆のパターンを示していた。

【今後の研究計画】

今後は、Ra1A, R-Ras, R-Ras2, Rheb 等他の Ras ファミリー分子及び Rho ファミリー分子単体での state の検出と標的存在下での state 遷移の観察を行い、標的認識時の state の遷移の法則を解析する。また、アミノ酸変異体を用いた NMR 及び X 線結晶構造解析により、state 遷移のメカニズムも解析する。

Rac を介したアンジオテンシン受容体の発現調節

九州大学・大学院薬学研究院・薬物中毒学
黒瀬 等

【背景】

細胞膜受容体を介した細胞応答において、受容体の発現レベルは応答の強さやアゴニストとの親和性を決定する重要な因子である。心筋の線維芽細胞を用いてアンジオテンシン受容体を介したシグナリングの解析を行っている過程で、百日咳毒素 (PTX) で細胞を処理するとアンジオテンシン 刺激による Ca^{2+} 応答が増強されるという奇妙な現象に遭遇した。そこで PTX とアンジオテンシン受容体との関係を解析し、低分子量 G 蛋白質の Rac を介した活性酸素の産生が受容体発現に関与していることを見出した。

【これまでの研究成果】

線維芽細胞を PTX で処理すると次のような結果が得られた。PTX 処理により、(1) アンジオテンシン 刺激による Ca^{2+} 応答の EC_{50} は減少し (親和性が増加し) 最大応答も増強された。しかし、ATP によるプリン受容体刺激は EC_{50} および最大応答とも影響を受けなかった。(2) $\text{G}\alpha_q$ 、 $\text{G}\alpha_{11}$ およびホスホリパーゼ C- $\beta 3$ の発現量は影響を受けなかった。(3) マイクロアレイ解析から IL-1 β の mRNA 発現の選択的な増加を観察した。また、抗 IL-1 β 抗体により PTX の Ca^{2+} 応答の増強は阻害された。(4) PI3K 依存性に Rac が活性化された。また、Rac が活性酸素の産生に関わっていた。(5) NF- κB が活性酸素依存性に活性化され、また Ca^{2+} 応答の増強効果は NF- κB の阻害により抑制された。(6) アンジオテンシン受容体の結合実験を行い、PTX 処理および IL-1 β 刺激により受容体の発現量が増加すること、およびこの増加が Rac および NF- κB 依存性を示すことを確認した。

【今後の研究計画】

本研究では、アンジオテンシン受容体の発現亢進に Rac-活性酸素産生系が大きな役割を担っていることを示した。我々は、心室筋細胞や心筋線維芽細胞を用い、Rac による活性酸素産生が MAP キナーゼや NFAT の活性化に関与していることを報告している^{1, 2}。本研究より、Rac が受容体の発現亢進にも関与していることが明らかになった。今後、心臓のシグナリングネットワークの構築に Rac の活性酸素産生系以外のターゲット分子を明らかにする必要がある。また、本研究により、細胞内シグナリングの解析で G_i の関与を調べるスタンダードとなっている試薬である PTX に、これまで考慮されていなかった作用もあることが明らかになった。

1. Nishida M. et al., J. Biol. Chem. 280, 18434-18441 (2005)
2. Fujii T. et al., J. Biol. Chem. 280, 23041-23047 (2005)

【背景】

環境変化に迅速に適応するため、ストレス応答 MAP キナーゼ経路は全ての真核生物に存在している。出芽酵母は高浸透圧で活性化される HOG 経路を有し、その上流に 2 つの独立した支経路 (SH01 経路、SLN1 経路) がある。このうち SH01 経路は高浸透圧刺激に応じて、Sho1 膜蛋白質から Ste20 PAK 様キナーゼ、Ste11 MAPKK キナーゼなどを介し Pbs2 MAPK キナーゼに活性化シグナルを伝達する。また Rho 型 G 蛋白質である Cdc42 の関与も知られているが、接合経路をはじめとする他の MAPK 経路と同様、活性型 Cdc42 が Ste20 との結合を介し、Ste20 の活性化に働くと考えられている以外、詳細な分子機能、分子機構については不明であった。

【これまでの研究成果と今後の研究計画】

HOG 経路の活性化を定量的に捉えるために開発した CRE-lacZ レポーターを用いて、関連因子の HOG 経路活性化への関与を調べた。興味深いことに活性型 Cdc42 と結合して Ste11 活性化に働くと考えられる Ste20 を欠失しても、活性化レベルは低下するが Ste11 欠失株のようにシグナルが完全に遮断されることはなかった。Ste20 と類似した Cla4 キナーゼの関与を考え、Ste20、Cla4 の両者の機能を失った変異株を作製したところ、SH01 経路の活性化は完全に抑えられ、Ste20 と Cla4 は HOG 経路において重複した機能を有することがわかった。

構成的活性型 Cdc42 の発現により HOG 経路は活性化されるが、これには Ste50 が必要であることがわかった。Ste50 は Ste11 結合蛋白質で、C 末に Ras 等との結合に関わる RA ドメインを有す。このドメインは高浸透圧に応じた HOG 経路活性化に必須で、RA ドメイン内の *ste50-P318L* 変異株も HOG 経路活性化に欠損を示す。Ste50 が RA ドメインを介して Cdc42 と相互作用する可能性を考え、*ste50-P318L* 変異株の高浸透圧感受性を抑圧する *CDC42* 変異体をスクリーニングした結果、Ste20 との結合部位とは異なる領域に変異をもつ *CDC42-L4P* が得られた。Cdc42 は Ste50、Ste20 とそれぞれ異なる領域で結合するアダプターとして経路活性化に働くことが示唆された。次に細胞膜に局在する活性型 Cdc42 との結合により Ste50 が細胞膜に移行する可能性を検討した。RA ドメインを欠損した Ste50 に膜局在配列を付加させると HOG 経路活性化の欠損が回復した。以上より高浸透圧で活性化された Cdc42 は Ste20 との結合を介し Ste20 を活性化し、Ste50 との結合を介し Ste50-Ste11 複合体を膜にリクルートすることで Ste20 による Ste11 のリン酸化を可能にしているという分子機構が考えられた。

今回の研究で Cdc42 活性化後のシグナル伝達機構に関しては理解が大いに進んだ。しかしながら Sho1 による高浸透圧感知から Cdc42 の活性化にいたる過程は依然として不明である。今後は高浸透圧に応答して Cdc42 が活性化されるメカニズムをその上流因子の同定を中心に明らかにしたい。

(参考文献) K.Tatebayashi et al. EMBO J.25:3033 3044(2006)

アポトーシス細胞貪食を誘導する細胞内情報経路の解析

金沢大学大学院医学系研究科・生体防御応答学分野
白土 明子

【背景】

生体内ではその一生を通じて、自己由来の不要あるいは有害な細胞が出現する。これらの「要除去細胞」にはアポトーシスが誘導され、食細胞がこれらを選択的に貪食除去することで生体恒常性が保たれる。食細胞が標的を取り込む時には、食細胞の細胞骨格構造が大きく変化する。このような細胞骨格変化には、低分子量 G タンパク質が関与すると理解されており、実際に、イムノグロブリン Fc 受容体を介する細菌の貪食では、Rac により細胞骨格再構成が起こると示されている。しかし、アポトーシス細胞の貪食では、取り込み時の受容体はこれとは異なっており、低分子量 G タンパク質の関わりを示す直接の証拠もない。本研究では、G タンパク質を介してアポトーシス細胞貪食を導く細胞内経路を明らかにする。

【これまでの研究成果】

私達はこれまでに、哺乳類マクロファージや精巣セルトリ細胞、また、シヨウジョウバエヘモサイトを食細胞として、アポトーシス細胞の選択的取り込みを規定する食細胞の受容体や標的細胞上の目印分子を同定してきた。このうち、精巣セルトリ細胞のクラス B スカベンジャー受容体タイプ I (SR-BI) は、アポトーシス精子形成細胞表層の膜リン脂質ホスファチジルセリン(PS)と直接結合して標的取り込みを誘導し、またこの反応は精子形成過程進行に必須である。最近の解析より、貪食時のセルトリ細胞では、SR-BI を介して MAP キナーゼ経路に情報入力されるとわかった。一方、シヨウジョウバエヘモサイトでは、EGF-リピートタンパク質の Draper がアポトーシス細胞の認識に関わることを見いだしており、現在、Draper リガンドの同定を行っている。

【今後の研究計画】

今後はまず、低分子量 G タンパク質が上記アポトーシス細胞貪食の制御を行っているか否かを解析し、関与する場合にはその種類を特定する。次に、取り込み受容体の違いによる貪食誘導性 G タンパク質の使い分け様式を調べる。そして、線虫の遺伝学的解析より報告された、貪食誘導性の細胞内因子群を候補として、取り込み受容体から G タンパク質に情報が伝わる経路を明らかにする。

【背景】

神経軸索は、様々な軸索ガイダンス分子に導かれてターゲット細胞に軸索を投射する。軸索ガイダンス分子の中で、semaphorin は代表的な反発作用を示す分子群である。我々は、これまでに Sema4D の受容体、Plexin-B1 の軸索反発作用に関わる細胞内情報伝達機構を解析した結果、Plexin-B1 が直接 R-Ras に対する GAP をコードし、R-Ras の活性を低下させて、R-Ras によるインテグリンの活性化を抑制することにより、軸索の伸長にブレーキをかけて、反発作用を発揮することを明らかにしてきた。また、この Plexin-B1 による R-Ras GAP 活性の発現には Rho ファミリーの1つ、Rnd1 が Plexin-B1 に結合することが必要であることも明らかにした。

一方、軸索の伸長には微小管の伸長が必須であり、最近、微小管の伸長は CRMP-2 により促進されており、また、CRMP-2 の機能は GSK3・によるリン酸化で抑制的に調節されていることが明らかにされた。そこで、Sema4D-Plexin-B1 による CRMP-2 を介した微小管の伸長に対する作用を解析した。

【これまでの研究成果】

ラット海馬初代培養神経細胞において、Sema4D は R-Ras の活性を低下させると共に、Akt と GSK3・のリン酸化を抑制し、Akt の活性抑制と GSK3・の活性化を引き起こした。さらに、CRMP-2 のリン酸化を促進した。この Plexin-B1 による Akt と GSK3・の脱リン酸化及び CRMP-2 のリン酸化には、R-Ras GAP 活性が必要であった。Plexin-A1 による Akt と GSK3・の脱リン酸化も R-Ras GAP 活性を必要とした。常時活性型 Akt の発現や GSK3・の阻害剤により、Sema4D による成長円錐の消失が阻害された。また、Akt、GSK3・の上流の制御分子である常時活性型 PI3-K 発現によっても Sema4D による作用は阻害された。これらの結果から、Sema4D-Plexin-B1 は R-Ras GAP 活性により、R-Ras の活性を抑制し、R-Ras による PI3-K の活性化を抑制し、Akt の活性低下、GSK3・の活性化により CRMP-2 をリン酸化し、CRMP-2 による微小管の伸長を阻害することにより退縮作用を発揮するものと考えられる。

【今後の研究計画】

Plexin-B1 は R-Ras GAP 活性で R-Ras の活性を抑制し、R-Ras による PI3-K の活性を抑制することにより、PIP3 の合成を抑制すると考えられる。一方、PIP3 は PTEN により分解されることが知られている。そこで、Plexin-B1 による PTEN の活性調節機構について調べる。

【背景】

神経細胞移動は複雑な脳組織の形成において必須の発生段階であるが、そこに関わる分子機構についてはまだあまり良く知られていない。その過程で神経細胞が大きく細胞形態を変化させるために、細胞骨格制御の鍵分子である Rho ファミリーG 蛋白質の関与が予想されていたが、Rac1 などのロックアウト動物では早期致死となるため、その神経細胞移動における働きは未解明であった。そこで、我々は「子宮内エレクトロポレーション法」を活用し、発生途上のマウス胚の局所脳に特定の遺伝子を導入することによって、Rho ファミリーG 蛋白質の神経細胞移動に果たす役割についてアプローチしようとしてきた。

【これまでの研究成果】

胎生 14.5 日胚のマウス大脳皮質の脳室帯の一部に Rac1 のドミナントネガティブ体を導入すると、神経細胞移動が強く抑制された。また、そこで機能する Rac1 の Guanin nucleotide exchange factor として STEF, Tiam1, P-Rex1 が同定された。それぞれに対するドミナントネガティブ体の導入によっても、神経細胞移動が阻害された。また、移動神経細胞においては JNK が Rac1 によって活性化されているということ、さらにその JNK がやはり神経細胞移動に関与しているということ、子宮内エレクトロポレーション法によって明らかにした。また、初代培養細胞などを用いた実験により、JNK が MAP1B のリン酸化を介して微小管ダイナミクスを制御し、移動神経細胞の先端突起の形成に関与しているらしいことが示唆された。以上から、STEF/Tiam1/P-Rex1-Rac1-JNK-MAP1B-微小管という Rac1 を中心としたシグナル伝達系が神経細胞移動に関与しているということが明らかになった。

【今後の研究計画】

他の Rho ファミリーG 蛋白質がいかにして神経細胞移動に関わっているのか、さらにそれら Rho ファミリーG 蛋白質がいかにして細胞外の環境（ガイダンスキューなど）に反応して活性化（あるいは不活性化）されるのか、下流のエフェクターとしてはどのようなものが神経細胞移動に関与しているのか、などについて、子宮内エレクトロポレーション法、タイムラプススライス培養系、および初代培養細胞系を用いて明らかにしていく。

また、我々は単一の遺伝子 (*Ptf1a*) を導入することで、神経細胞移動を放射状方向から接線方向へと変化させることに成功した。ある培養細胞株では細胞の移動方向の決定に Cdc42 などが関与しているという報告もあるが、神経細胞の移動様式の選択の仕方についてはまだ全く何も知られていない。そこで、*Ptf1a* 遺伝子についての研究を進めることによって、その問題にアプローチしていきたいとも考えている。

【背景】

細胞外プロトン濃度即ち pH 低下を感知して細胞機能が変化することは様々な生体調節系で観察されている。例えば、血管系では、アシドーシスによる血圧低下、摘出血管での弛緩反応、細胞レベルでの細胞内 cAMP、カルシウム濃度変化など様々な応答が観察される。また、炎症細胞、免疫細胞、癌細胞でも種々の細胞外 pH 依存性の作用が報告されている。このような pH 変化に伴う反応は、従来単に pH 感受性という表現で片付けられてきた。これは、細胞外 pH を感知するプロトンセンサーの実体が不明であったことに他ならない。最近、我々を含む国内外のグループによって OGR1 ファミリー G 蛋白質共役受容体 (OGR1、GPR4、G2A、TDAG8) が細胞外 pH 低下に应答して細胞内シグナル伝達系を活性化することが明らかにされた。これらの受容体ファミリーは発現パターンは異なるが生体に広く発現している。従って、この受容体ファミリーは、実体が不明であったプロトンセンサーであることが期待される。

【これまでの研究成果】

OGR1 ファミリー G 蛋白質共役受容体を過剰発現した細胞を用い、これらの受容体はホスホリパーゼ C 系、アデニル酸シクラーゼ系など複数の細胞内シグナル伝達系に連関していることが判明している。また、我々は血管平滑筋細胞を用い、受容体 siRNA 実験からこれらの受容体が実際に細胞外 pH 低下による cAMP 産生、プロスタサイクリン産生に関わっていることを証明した。

【今後の研究計画】

このように OGR1 ファミリー G 蛋白質共役受容体は様々な三量体 G 蛋白質を介した細胞内シグナル伝達系と連関していることが示唆されているが、プロトンセンサー機能を保証する G 蛋白シグナルの詳細は不明である。また、従来の研究は主に受容体過剰発現細胞における知見からの推定であり、生理的な細胞に関しては、我々の解析した血管平滑筋細胞などまだ実例は乏しい。更に、生体レベルでの機能はほとんど解析されていない。そこで、今後はこれらの課題に関して、受容体、G 蛋白質に対する siRNA, ドミナントネガティブ遺伝子を用い血管平滑筋細胞、内皮細胞、炎症性細胞、がん細胞など細胞レベル、受容体ノックアウトマウスを用い生体レベルで解析したい。

哺乳類細胞の極性決定時における G 蛋白質の役割とその制御機構

九州大学・生体防御医学研究所
住本英樹、鎌倉幸子

【背景】

種々の細胞が正常に機能し調節されるためには、細胞の極性 (cell polarity) が適切に形成されることが必要である。ショウジョウバエの neuroblast の極性形成においては、3 量体 G 蛋白質が重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。この時の G_i 蛋白質の制御には、Pins という GDI 蛋白質が重要であり、Pins は受容体非依存性に GDP $G_{\alpha i}$ と結合し、その結果遊離された $G_{\beta\gamma}$ は未知のエフェクター分子を介して極性形成に与る。極性形成に関わる 2 つの蛋白質複合体、即ち「Pins- $G_{\alpha i}$ 複合体」と「Par3-Par6-aPKC 複合体」は independent に働くわけではなく、ショウジョウバエでは Inscuteable (Insc) というアダプター分子により結ばれ (クロストークし) 協調して機能することが知られているが、哺乳類の極性決定においては、「Pins- $G_{\alpha i}$ 複合体」や $G_{\beta\gamma}$ 、Insc の果たす役割は殆ど分っていない。

【これまでの研究成果】

(1) 私達は、哺乳類の「Par3-Par6-aPKC 複合体」についての生化学的、構造生物学的、あるいは細胞生物学的解析を行ってきたが、最近、ショウジョウバエ Insc の一次配列情報をもとにヒト Insc の cDNA を単離した。ヒト Insc は、ハエ Insc と 25% のアミノ酸しか同一ではないが、ヒト Par3 及びヒト Pins ホモログ (LGN と AGS3) に同時に結合できることから、機能的な Insc ホモログであると考えられた。これはまた、哺乳類の細胞極性形成においても、「Pins- $G_{\alpha i}$ 複合体」と「Par3-Par6-aPKC 複合体」が Insc を介して協調して働く可能性を示唆している。

(2) また私達は、yeast two-hybrid 法を用いたスクリーニングを行い、ヒト Par3 に結合する新規分子として Par3BMP1 (Par3-binding membrane protein 1) を単離した。Par3BMP1 は糖鎖を持つ type I の膜貫通型蛋白質であり、C 末端の PDZ 結合モチーフを用いて Par3 の PDZ ドメインと結合した。Par3BMP1 の過剰発現は、上皮細胞の内在性 Par3 の tight junction (TJ) への局在については TJ 形成 (細胞極性形成) を阻害することから、Par3BMP1 による Par3 の膜へのリクルートが細胞極性形成に重要な役割を果たすと考えられる。

【今後の研究計画】

特に、「LGN/AGS3- $G_{\alpha i}$ 複合体」、 $G_{\beta\gamma}$ 、及び「LGN/AGS3- $G_{\alpha i}$ 複合体」と「Par3-Par6-aPKC 複合体」を繋ぐ分子である Insc が、哺乳類上皮細胞の極性形成 (= TJ 形成) 及び海馬ニューロンの極性形成 (= 軸索形成) にどのように関与するのか、に焦点をあて研究を進めたい。

【背景】

視興奮の初期過程において、視細胞のGタンパク質トランスデューションは細胞内光情報伝達・増幅の中心的役割を果たす。この過程には多くの分子制御メカニズムが働き、視細胞の光シグナル伝達・増幅は緻密に調節されている。特に、順応に伴う視細胞の光情報伝達効率のダイナミックな変化は、周囲の光環境に応じて視細胞の光感度を適切に調節するために極めて重要である。桿体視細胞トランスデューシン ($T\alpha/T\beta\gamma$) のサブユニットは、C末端Cys残基がファルネシル化されており、この翻訳後修飾は *in vitro* における $T\alpha/T\beta\gamma$ を介した光シグナル伝達に必須である。一方、他の組織に存在するGタンパク質サブタイプの多くはゲラニルゲラニル化されており、これら脂質修飾の違いによってGタンパク質の性質は異なるが、その生理的意味は不明である。視細胞に特異的な $T\gamma$ のファルネシル化が桿体の光情報伝達にいかに関与しているかを理解するために、私共は $T\gamma$ のファルネシル基がゲラニルゲラニル基に置換される点変異 (S74L) を導入したノックインマウスを作製した。

【これまでの研究成果】

S74L変異マウスにおいては野生型と比較して、網膜形態や視細胞のタンパク質レベルに変化は見られず、暗順応状態における単一視細胞の光応答にも有意差は認められなかった。また単一光量子に対する応答波形にも変化は見られなかった。しかし、100luxの順応光を照射後に網膜電図 (ERG) a波を記録解析した結果、野生型マウスの光応答は暗順応状態の15%にまで減弱して明瞭な明順応を示したのに対し、S74L変異マウスにおいては光応答の減弱が40%にとどまった。分子的な表現型としては、S74L変異マウス視細胞において、光照射に伴う $T\beta\gamma$ の外節から内節への細胞内移動が著しく抑制されていた。この抑制は、ゲラニルゲラニル化 $T\beta\gamma$ の視細胞外節膜への親和性が、ファルネシル化 $T\beta\gamma$ と比較して増大したためであると考えられた。以上の結果より、 $T\gamma$ の選択的なファルネシル化はトランスデューションの光依存的な細胞内移動に重要な役割を果たし、明順応における光感度調節に関与していると考えられた。

【今後の研究計画】

今後は、G蛋白質サブユニットがイソプレニル化されている意義を解明するため、 $T\gamma$ 遺伝子に変異を加えて非修飾型に改変した組換えマウスを作製し、その視細胞の光シグナリングを生化学的に解析すると共に光応答の電気生理学的解析を行う。

パルミトイルサイクルによるG蛋白質の動態制御機構の解明

国立長寿医療センター・研究所・遺伝子蛋白質解析室
深田正紀、深田優子、堤良平

【背景】

分子スイッチとして細胞内情報伝達の要として機能するGTP結合蛋白質の多くは特定の膜マイクロドメインに局在することによりその生理機能を遂行する。翻訳後脂質修飾の一つであるパルミトイル化脂質修飾は三量体G蛋白質のG (Gs, Gi, Gqなど)、低分子量G蛋白質(H/N-Rasなど)、G蛋白質活性制御蛋白質(RGS4など)および様々なG蛋白質共役受容体(GPCR)に見られ、これら分子の局在、機能を外界刺激依存性に制御している。しかし、パルミトイル化修飾が発見されて30年以上その責任酵素は同定されず、G蛋白質のパルミトイル化サイクルによる局在制御機構は不明であった。最近、私どもはパルミトイル化反応の責任酵素群を同定した。本研究ではG蛋白質のパルミトイル化サイクルによる局在制御機構の解明を目指して1)各G蛋白質をパルミトイル化する特異酵素の同定、2)パルミトイル化酵素の活性制御機構の解析、及び3)パルミトイル化酵素によるG蛋白質動態制御機構の解析を行う。

【これまでの研究成果】

私どもはG蛋白質を含む様々なシグナル分子の局在決定に中心的な役割を果たすパルミトイル化修飾の分子機構を明らかにするために、*in silico*解析により全23種類のパルミトイル化酵素群を世界に先駆けて単離した。さらに、培養細胞系を用いてパルミトイル化基質蛋白質の責任酵素をスクリーニングするアッセイ系を確立し、GsおよびGqに対して特異候補酵素(G-PATと命名)を同定して、パルミトイル化酵素にサブファミリーが存在することを明らかにしつつある。またGFP融合蛋白質を用いてGsおよびG-PATの細胞内動態を生細胞レベルでタイムラプス全反射顕微鏡を用いて可視化する系を確立した。現在、G-PATをノックダウンした際のGsの細胞内局在および動態を検討している。

【今後の研究計画】

引き続きパルミトイル化修飾をうける各種G蛋白質(Gi, N-Rasなど)やG蛋白質活性制御蛋白質(RGS4やR7BPなど)に対し、全てのパルミトイル化酵素を用いて責任酵素をスクリーニングする。これらの結果を基に23種類の酵素ファミリーをサブファミリーに分類しサブファミリー特異的な認識配列を明らかにする。

Gsの細胞内動態がG-PATの下流において外界刺激によりどのように制御されるかを検討していく。

【背景】

発生過程において、細胞は集団となってダイナミックに形を変え移動する。このような形態形成運動では、個々の細胞の運動は時空間レベルで厳密に制御されなければならない。単独の細胞の運動において、三量体 G タンパク質 (G タンパク質) を介したシグナル伝達は重要な役割を果たしている。しかし、形態形成運動における G タンパク質の役割は不明な点が多い。また最近、Ric8 や RGS と呼ばれる G タンパク質活性調節因子が多数同定されてきた。しかし、それらの因子による G タンパク質の活性調節が形態形成運動にどのような役割をもつのか、わかっていない。私達は、ショウジョウバエ胚の原腸陥入をモデルに、形態形成運動における G タンパク質の役割と活性化機構を解析している。

【これまでの研究成果】

ショウジョウバエの 2 種の G 遺伝子、Cta (G_{12/13}) と G_i の変異胚で原腸陥入の異常が観察された。Cta と G_i 変異ではそれぞれ腹側中央の細胞 (MV 細胞) と側方の細胞 (LV 細胞) の形態変化に異常が観察され、複数の G が原腸陥入の特異的な細胞運動を制御することを示唆した。Ric8 ヌル変異胚では、MV と LV 細胞の形態が異常になるとともに、Cta と G_i が膜に局在できず細胞質に散在していた。このことは Ric8 が G タンパク質の膜局在に必須であることを示している。さらに私達は Ric8 のミスセンス変異を同定し、ヌル変異とは異なる原腸陥入の異常を観察した。この変異では G タンパク質の局在が正常であったことから、Ric8 の新たな分子機能を調べるツールとなることが期待された。さらに、RGS の 1 つである Gprk2 遺伝子も原腸陥入に必須であることを見いだした。変異胚を観察すると、MV 細胞の領域が広がるとともに形態変化自体もより強くなり、Ric8 変異と対照的な表現型を示した。これらの結果は、Ric8 と Gprk2 がそれぞれ G タンパク質の活性を正と負に調節することを予想させるとともに、G タンパク質の活性のファインチューニングが原腸陥入における細胞運動の制御に必須であることを示唆している。

【今後の研究計画】

細胞運動のライブイメージング解析：細胞運動のダイナミクスを定量的に解析するために、原腸陥入のライブイメージングを行う。細胞運動の時空間レベルの解析から変異胚と野生型胚を比較し、G タンパク質シグナルの細胞運動における役割を明確にする。

G タンパク質活性調節機構の解析： Ric8 や Gprk2 の G タンパク質活性調節における機能と細胞運動への役割を明らかにする。Ric8 ミスセンス変異を用いて、G タンパク質との遺伝的相互作用を調べるとともに、生化学的活性への影響を調べる。Gprk2 はレセプターをリン酸化し不活性化する機能が知られている。変異胚を用いて Gprk2 の基質を生化学的に同定し、G タンパク質シグナルの上流で起る分子メカニズムを明らかにする。