

# 博士論文

論文題目      cyclic AMP 依存的 RhoA リン酸化の検討

氏 名                      三 谷 康 二

## 目次

|        |    |
|--------|----|
| • 略語一覽 | 2  |
| • 要旨   | 4  |
| • 序文   | 5  |
| • 方法   | 23 |
| • 結果   | 32 |
| • 考察   | 56 |
| • COI  | 73 |
| • 謝辞   | 74 |
| • 引用文献 | 75 |

## 略語一覧

A : aqueous phase (水相)

Ala : alanine (アラニン)

Arg : arginine (アルギニン)

Asn : asparagine (アスパラギン)

A II : angiotensin II (アンジオテンシン II)

cAMP : cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate (cyclic AMP)

COS-7 細胞 : CV-1 in origin and carrying the SV40 genetic material -7 細胞

Cys : cysteine (システイン)

D : detergent phase (界面活性剤相)

DMEM 培地 : Dulbecco's modified Eagle's medium 培地

FBS : fetal bovine serum (ウシ胎児血清)

Fsk : forskolin (フォルスコリン)

GDP : guanosine diphosphate

GFP : green fluorescent protein (緑色蛍光タンパク質)

GGT- I : geranylgeranyltransferase type- I

Gly : glycine (グリシン)

GPCR : G-protein coupled receptor (G タンパク質共役受容体)

GTP : guanosine triphosphate

HEK 293 細胞 : human embryonic kidney 293 細胞

ICMT : isoprenylcysteine carboxymethyl transferase

LPA : lysophosphatidic acid (リゾホスファチジン酸)

Lys : lysine (リシン)

MLCP : myosin light chain phosphatase

MYPT-1 : myosine phosphatase targeting subunit-1

Pita : pitavastatin (ピタバスタチン)

PKA : protein kinase A

PKG : protein kinase G

PKN : protein kinase N

RCE1 : Ras converting enzyme 1

RhoGAP : Rho GTPase activating proteins

RhoGDI : Rho-specific guanine nucleotide dissociation inhibitors

RhoGEF : Rho guanine nucleotide exchange factors

Ser : serine (セリン)

siRNA : small interfering ribonucleic acid (低分子干渉 RNA)

Thr : threonine (スレオニン)

Val : valine (バリン)

WT : wild-type (野生型)

## 要旨

RhoA は細胞骨格形成など多彩な役割を担う。cAMP によるその抑制は、無細胞系実験を基に RhoA のリン酸化によるとされていたが、細胞でのその検出は不十分で未解決だった。我々はこの問題に挑み、RhoA でなく RhoGDI $\alpha$  のリン酸化がその機序であると証明した。本研究では多くの細胞で RhoA のリン酸化が検出できない理由を追究し、リン酸化制御機構を解明した。過剰発現させた RhoA はリン酸化され、prenylation を変異導入で阻害するとそれは増加し、スタチンで阻害すると内在性 RhoA もリン酸化された。以上より RhoA は、内在性のものには存在しない unprenylated-form が選択的にリン酸化されると結論した。この選択的リン酸化の意義の解明を次の課題とした。

## 序文

低分子量 G タンパク質は、GTP と結合して (GTP 結合型 [GTP-form]) 活性化、GDP を結合して (GDP 結合型 [GDP-form]) 不活性化することで、細胞内の情報伝達のスイッチのオン/オフを担うタンパク質の一群である (図 1)<sup>1,2)</sup>。ヒトの細胞では 150 種以上の低分子量 G タンパク質が発見されており、Ras、Rho、Rab、Arf、Ran の 5 つのサブファミリーに大きく分類される (図 2)<sup>3,4)</sup>。この中の Rho サブファミリー G タンパク質に属する RhoA は、アクチンフィラメントの合成や細胞骨格の構築を代表として、細胞の増殖サイクルや接着能の制御、平滑筋細胞では筋収縮などの生理的作用に関与しており<sup>1,5,6)</sup>、悪性腫瘍・脳卒中・心血管病変 (心不全や虚血性心疾患など)・呼吸器疾患 (気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患 [COPD] など)・緑内障のような多数の疾患にも関わりを持っている<sup>3,7-10)</sup>。このため RhoA やその他の Rho サブファミリー G タンパク質を介する細胞内シグナルは、治療のターゲットとして精力的に研究が進められており、くも膜下出血治療薬 (ファスジル) や緑内障治療薬 (リパスジル) のように、既に日常臨床で使用可能となっている薬剤 (Rho-kinase 阻害薬、図 3) も存在する<sup>11,12)</sup>。内分泌学の分野においても RhoA の役割についての研究が行われており、インスリンの分泌<sup>13)</sup>・作用<sup>14)</sup>や副腎皮質ホルモンの分泌<sup>15)</sup>へ関与することや、甲状腺ホルモンが RhoA を介するシグナルへ影響を及ぼすこと<sup>16)</sup>、また破骨細胞における役割<sup>17-19)</sup>などについての報告がある。

RhoA はリボソームで翻訳された後、geranylgeranyltransferase type- I (GGT- I) によって C 末端に近い 190 位のシステイン (Cys) にイソプレノイド脂質の 1 種であるゲラニルゲラニル基 (図 4) が付加される (プレニル化 [prenylation])。次に小胞体にお

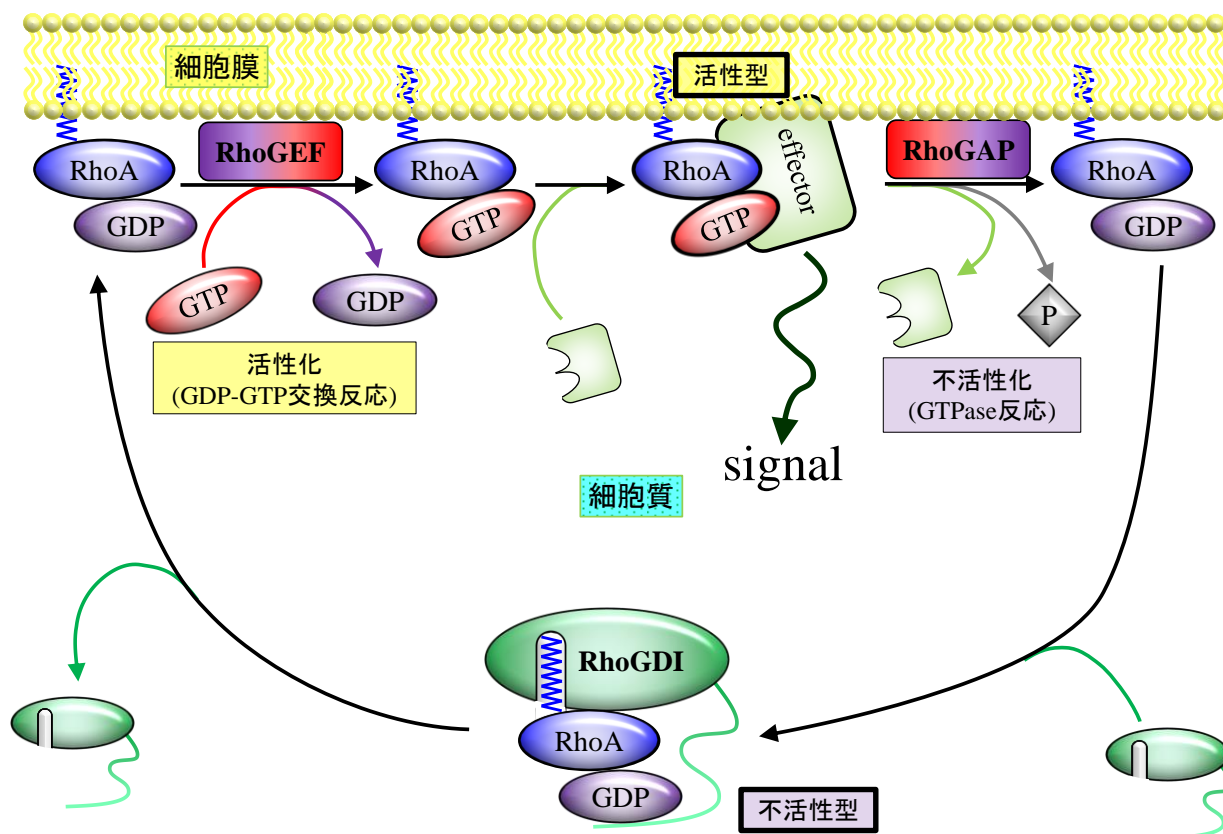


図 1 : RhoA の活性化と不活性化のサイクル

RhoA の大部分 (90%以上) は不活性型の GDP-form で、RhoGDI と結合し細胞質に存在している。活性化の刺激が加わると、RhoGDI が解離して細胞膜に移行し、RhoGEF によって GDP が GTP に交換される。この GTP-form の RhoA が活性型で、エフェクターと結合してそれを活性化し、シグナルを下流へ伝える。不活性化は、GTP-form の RhoA に RhoGAP が作用し、GTPase 活性を増幅して GTP を GDP に加水分解することでもたらされる。GDP-form に戻った RhoA は、RhoGDI と結合して再び細胞質へ回収され、次の活性化に備えられる。(文献 1、2 を参考に作図)

P : リン酸基

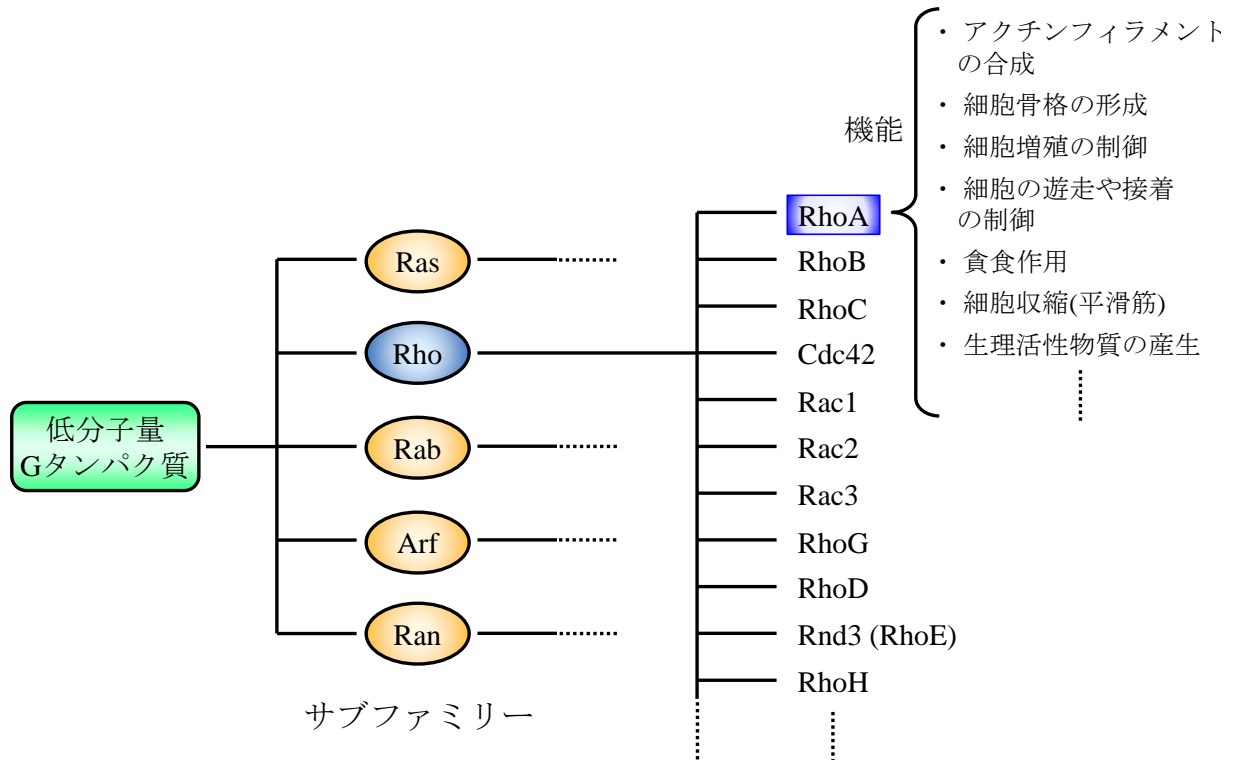


図 2 : 低分子量 G タンパク質の系統図

低分子量 G タンパク質は、大きく 5 つのサブファミリーに分類される。RhoA は、そのうちの 1 つ、Rho サブファミリー G タンパク質に属しており、細胞の生理的機能に多岐にわたって関与している。(文献 3-6 を参考に作図)



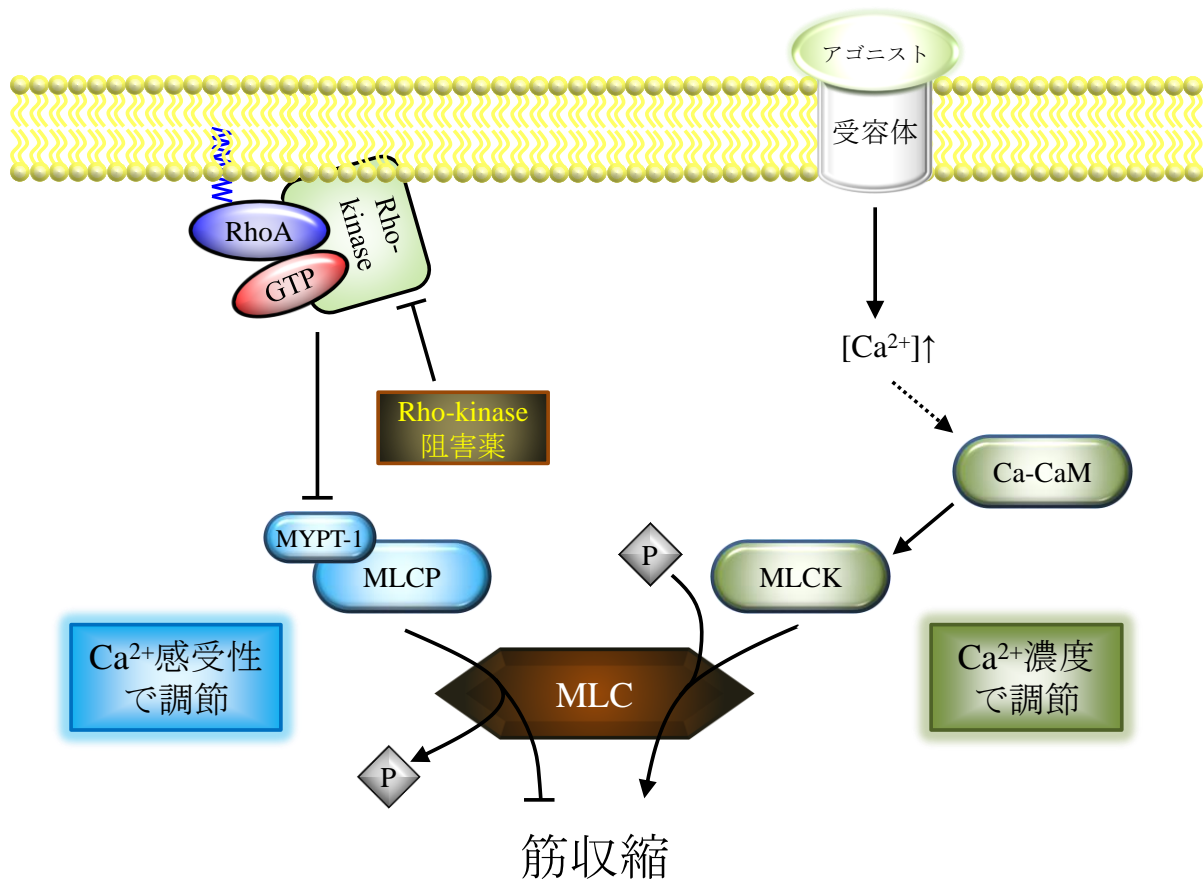


図3：RhoAによる平滑筋収縮の制御と、Rho-kinase阻害薬の作用点

平滑筋の収縮は、ノルアドレナリンなどのアゴニストの刺激により、細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入や小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出が起こり、Ca-CaMの複合体形成を介してMLCKがMLCをリン酸化することで生じる。これがCa<sup>2+</sup>濃度による平滑筋収縮の古典的な制御経路である。

一方、MLCを脱リン酸化するMLCPはこの経路に拮抗し、筋弛緩に作用する。RhoAは、そのエフェクターの1つであるRho-kinaseを活性化してMLCPのサブユニットであるMYPT-1をリン酸化し、MLCPを抑制する。ゆえにRhoAは、筋収縮と筋弛緩のバランスを前者に傾ける作用を示す。この経路はCa<sup>2+</sup>濃度の変化とは独立したものであり、Ca<sup>2+</sup>への感受性を変化させて平滑筋収縮を制御している、と捉えられることもある。

Rho-kinase阻害薬ファスジルは、Rho-kinaseを阻害することで筋弛緩作用を発揮し、くも膜下出血術後の脳血管攣縮への効果が認められている。(文献11、12を参考に作図)

Ca-CaM : calcium-calmodulin complex

MLC : myosin light chain

MLCK : MLC kinase

MLCP : MLC phosphatase

MYPT-1 : myosin phosphatase targeting subunit-1

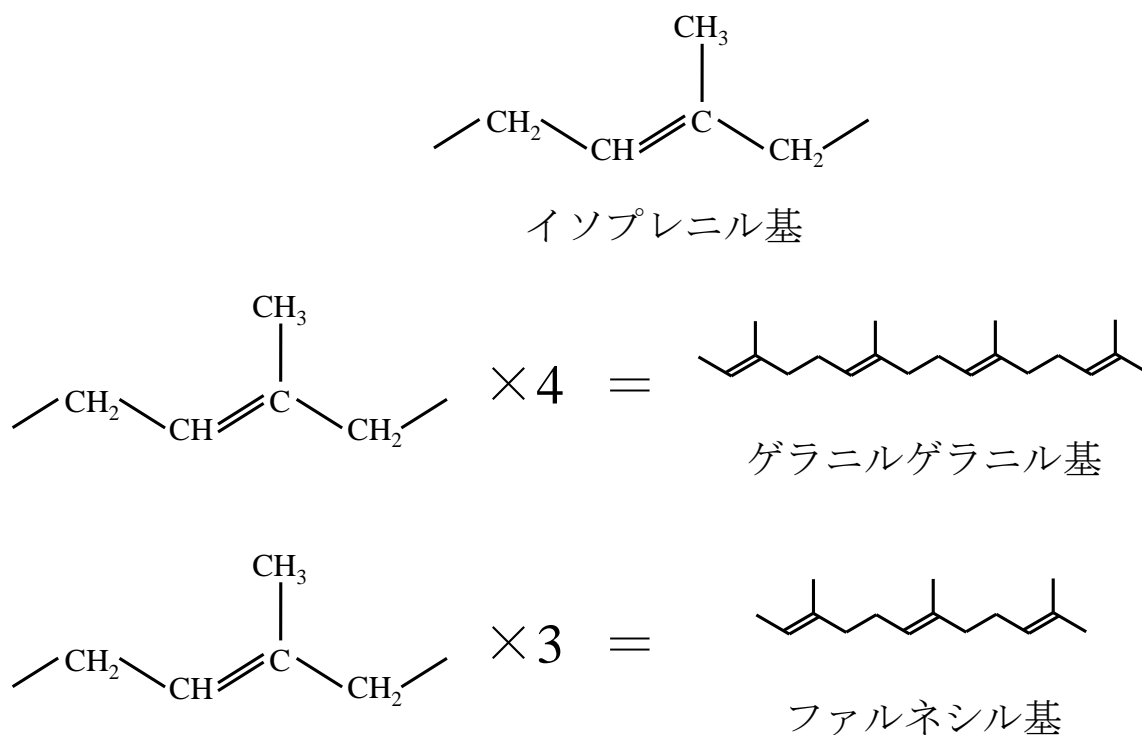


図4：イソプレノイド脂質の構造

イソプレニル基を基本構造とし、それが複数鎖状に結合した脂肪鎖は、イソプレノイド脂質と呼ばれる。イソプレニル基が4つ連なったものがゲラニルゲラニル基であり、RhoA など多くの低分子量 G タンパク質の翻訳後修飾に利用される。一方 Rac1 など、イソプレニル基が3つ連なったファルネシル基が付加される低分子量 G タンパク質も一部存在する。このゲラニルゲラニル基、またはファルネシル基が付加される翻訳後修飾を、プレニル化 (prenylation) と総称する。

いて Ras converting enzyme 1 (RCE1) によりその C 末端側の残り 3 残基が切断され、続いて isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT) によって、新たに末端となった Cys (prenylation を受けた Cys でもある) のカルボキシル基にさらにメチル化が加わる (図 5)<sup>20,21)</sup>。

RhoA を含む Rho サブファミリー G タンパク質の活性化/不活性化サイクルの古典的なモデル (図 1) では、その活性化には細胞膜への移行が必須とされている。それには脂肪鎖であり細胞膜との親和性を持つゲラニルゲラニル基 (一部の Rho サブファミリー G タンパク質ではファルネシル基 [図 4]) の存在が大きな役割を担うため、翻訳後修飾で prenylation を受けることは、Rho サブファミリー G タンパク質がその生理的作用を発揮する上で重要である<sup>22,23)</sup>。またこの活性化/不活性化サイクルに関与するタンパク質として、RhoGEF、RhoGAP、RhoGDI の 3 つがある (図 1、表 1)<sup>1,6,24,25)</sup>。RhoGDI にはゲラニルゲラニル基が入り込めるような形のポケット様構造があり、ゲラニルゲラニル基は Rho サブファミリー G タンパク質と RhoGDI との複合体形成にも関与しているとされる<sup>22)</sup>。

RhoA の活性化は、RhoGDI と解離してゲラニルゲラニル基がタンパク質の表面に露出して細胞膜に局在できるようになり、さらに RhoGEF が作用して GDP を GTP に変換することでもたらされる。RhoGEF は、リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid [LPA])・トロンビン・アンジオテンシン II (A II)・エンドセリンなどのアゴニストがそれぞれの受容体に結合し、共役するヘテロ三量体 G タンパク質 ( $G_{q11}$  や  $G_{12/13}$ ) を経て伝えられるシグナルによって刺激される<sup>26,27)</sup>。この他にも、チロシンキナーゼやホスホリパーゼ C によって刺激される経路も発見されている (図 6)<sup>11)</sup>。さらに RhoA は、Rac1 や Cdc42、Rnd3 のような他の Rho サブファミリー G タンパク質との

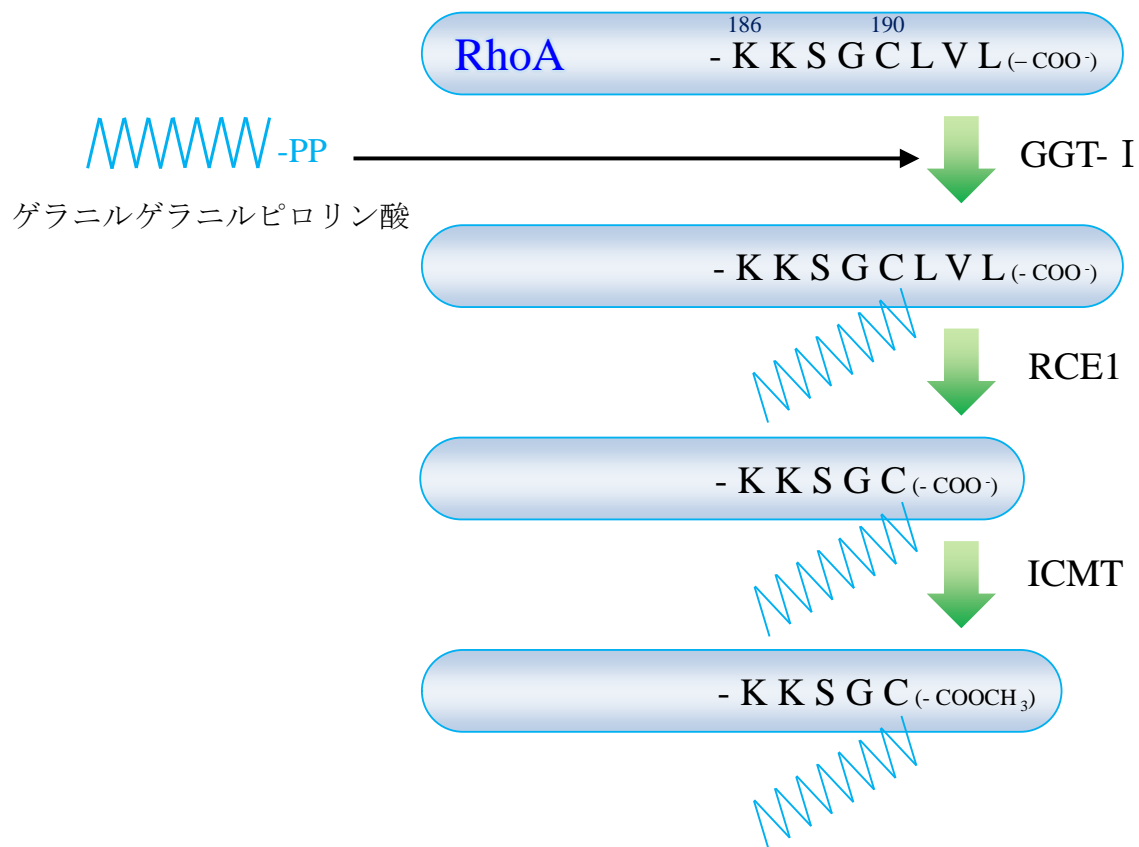


図 5 : RhoA の翻訳後修飾

RhoA の 186 位以降の C 末端のアミノ酸配列を示した。

RhoA はリボソームで翻訳された後、次の 3 段階から成る修飾を受ける。まず GGT-I の作用により、ゲラニルゲラニルピロリン酸などからゲラニルゲラニル基が 190 位の Cys の SH 基に転移する。続いて小胞体で、その C 末端側の 191~193 位のロイシン-バリン-ロイシンが RCE1 によって切断される。さらに ICMT により、新たに C 末端となった 190 位の Cys のカルボキシル基にメチル化が加わる。(文献 20、21 を参考に作図)

GGT- I : geranylgeranyltransferase type- I

RCE1 : Ras converting enzyme 1

ICMT : isoprenylcysteine carboxymethyl transferase

表 1： Rho サブファミリーG タンパク質の活性化や不活性化に関与するタンパク質

|  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>RhoGEF</u></li> </ul> <p>Rho guanine nucleotide exchange factors</p>                 | <p>Rhoに結合したGDPをGTPに交換<br/>⇒ Rhoを活性化させる</p> <p>60種類以上が同定</p>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>RhoGAP</u></li> </ul> <p>Rho GTPase activating proteins</p>                          | <p>Rhoに内在するGTPase活性を促進し、GTPをGDPに加水分解<br/>⇒ Rhoを不活性化させる</p> <p>70種類以上が同定</p>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>RhoGDI</u></li> </ul> <p>Rho-specific guanine nucleotide dissociation inhibitors</p> | <p>Rhoと結合して複合体を形成し、様々な働きをする</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• GDP-formで細胞質に貯蔵</li> <li>• 特定の膜分画への輸送</li> <li>• 分解抑制</li> <li>• シヤペロン作用など</li> </ul> <p>3種類が同定</p> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• (エフェクター)</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rho-kinase</li> <li>• mDial</li> <li>• PKN</li> <li>• Rhotekin</li> </ul> <p>60種類以上が同定</p> <p>など</p>                                |

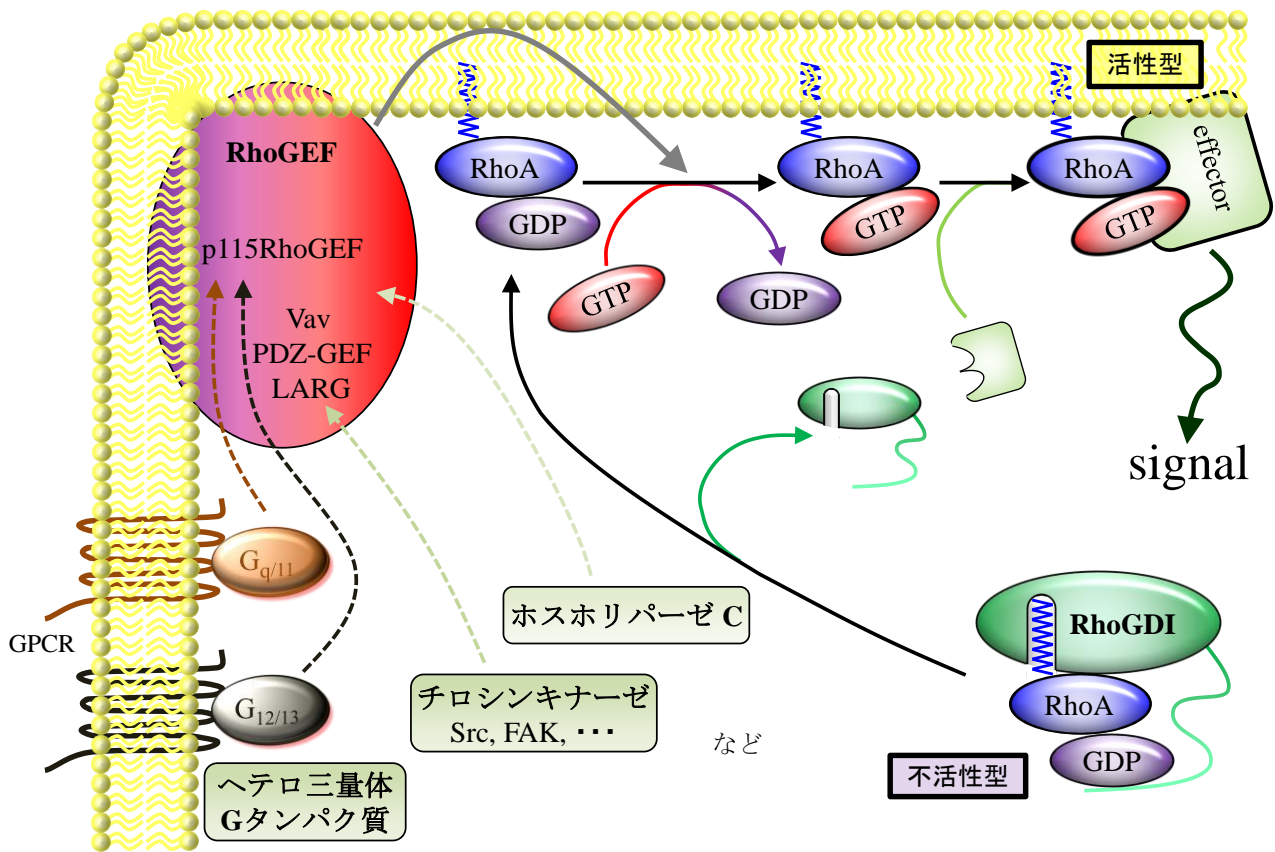


図 6 : RhoA を活性化する刺激

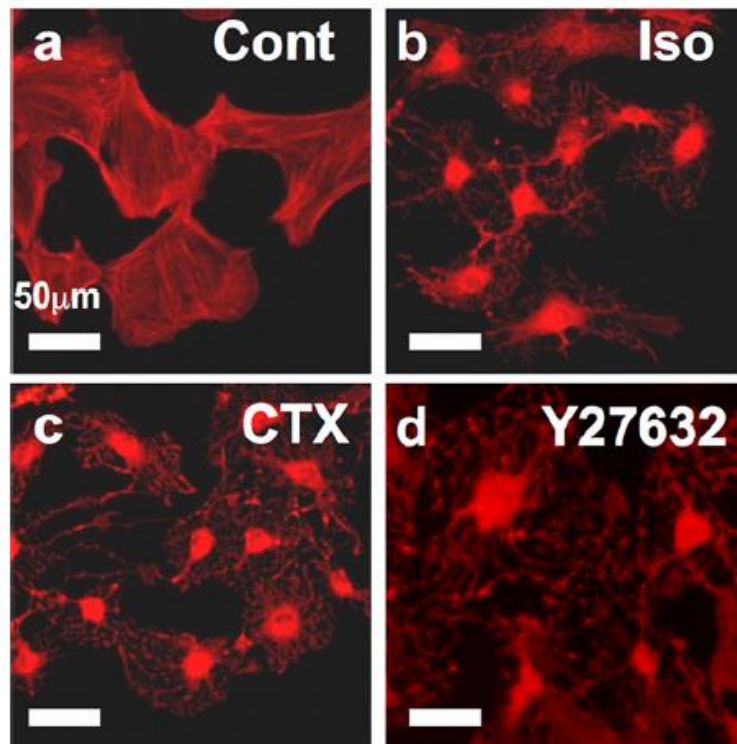
RhoA は、RhoGDI から解離して細胞膜に移行し、RhoGEF により結合している GDP が GTP に変換されることで活性化される。RhoGEF は、ヘテロ三量体 G タンパク質 ( $G_{q/11}$ 、 $G_{12/13}$ )、チロシンキナーゼ、ホスホリパーゼ C などにより刺激される。(文献 11、26、27 を参考に作図)

GPCR : G タンパク質共役受容体 (G-protein coupled receptor)

間で、RhoGEFなどを介して互いを刺激、あるいは抑制する関係にあることも報告されている<sup>23)</sup>。細胞膜で活性化したRhoAは、Rho-kinase・protein kinase N (PKN)・Rhotekinなどに代表されるエフェクター(表1)と結合し、下流にシグナルを送る。この活性化は、RhoGAPによってRhoAに内在するGTPase活性が促進されてGTPがGDPに加水分解され、GDP-formに戻ることで解除される。そしてRhoAは再びRhoGDIと複合体を形成して細胞質に戻る(図1)<sup>1,6,11,25)</sup>。

一方*Clostridium botulinum*のC3 toxinを細胞に作用させると、RhoAは41位のアスパラギン(Asn)がADPリボシル化を受け、RhoGDIからの遊離や細胞膜への移行が障害される<sup>28-30)</sup>。また*Clostridium difficile*のtoxin Bは、RhoAの37位のスレオニン(Thr)をグルコシル化し、活性型のGTP-formとエフェクターとの結合を妨げるなどの作用を示す<sup>29,31,32)</sup>。つまりこの2つの毒素は、RhoAを抑制する作用を持つ。RhoAの活性が阻害されるとエフェクターの1つであるRho-kinaseも活性化できず、その下流で制御されているアクチンフィラメントの合成が低下し、線維芽細胞(fibroblast)などの細胞では形態の極性が失われて丸く小さく変化してしまう現象(cell rounding)が観察される<sup>6,28,31,32)</sup>。ヘテロ三量体Gタンパク質のG<sub>s</sub>を活性化するアゴニストやコレラ毒素のようなcyclic AMP(cAMP)を増加させる刺激でも同様のcell roundingが生じることから、cAMPもRhoAを抑制すると考えられた(図7A)。Langらは、cAMPによって活性化されるprotein kinase A(PKA)がRhoAの188位のセリン(Ser)をリン酸化することを無細胞系の実験で見出し、細胞におけるcAMPによるRhoA抑制の機序に関して次のような説を提唱した<sup>34)</sup>。「PKAによるRhoAのリン酸化は、細胞膜に局在する活性化状態のGTP-formのRhoAに選択的に行われる。リン酸化されたRhoAはRhoGDIとの親和性が増加し、活性を発揮する場である細胞膜から細胞質へ

A



B

HA-RhoGDI $\alpha$  WT S174A

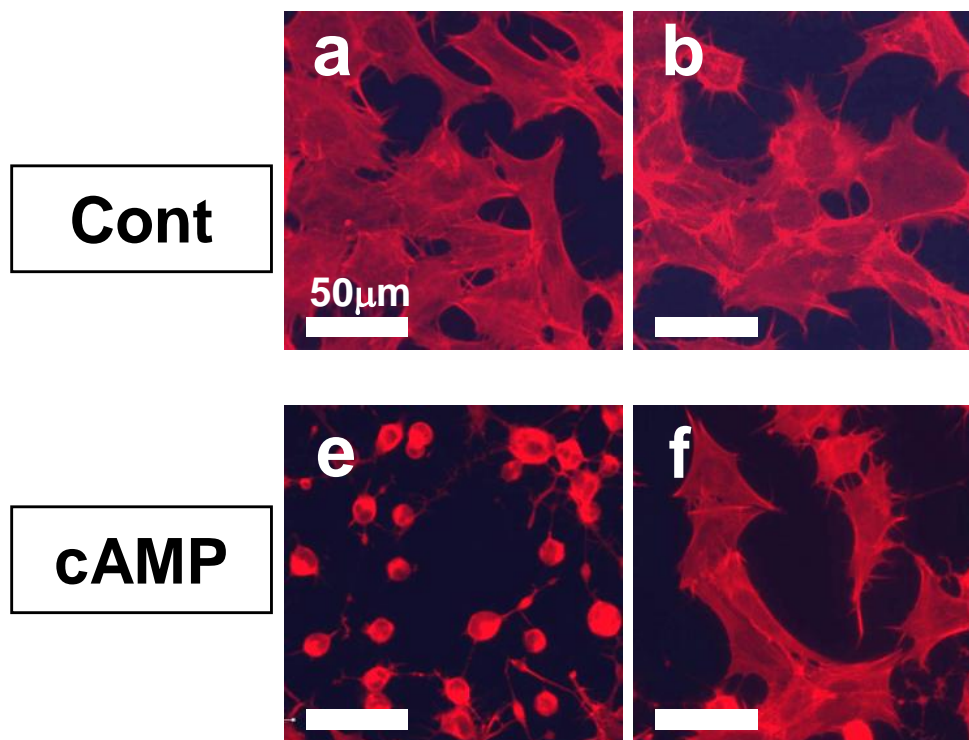


図 7 : cAMP による刺激と cell rounding



図 7 : cAMP による刺激と cell rounding

Texas Red X-Phalloidin (from Thermo Fisher Scientific 社) を用いて、ラット cardiac fibroblast の phalloidin 染色を行った。phalloidin は重合したアクチンに特異的に結合するタンパク質で、それを蛍光色素で標識することにより、細胞骨格を形成するアクチンフィラメントの構造を観察することができる。

A. 各種試薬を投与して、ラット cardiac fibroblast の形態変化を観察した。

a : コントロール (Cont)

b : イソプロテレノール (Iso) 10  $\mu$ M、1 時間

c : コレラ毒素 (CTX) 100 ng/mL、3 時間

d : Y27632 10  $\mu$ M、1 時間

$\beta$  刺激薬であるイソプロテレノール (b)、あるいはコレラ毒素 (c) で細胞内の cAMP を増加させると、未処理のコントロール (a) と比較して cardiac fibroblast は丸く小さく変形する。これは Rho-kinase 阻害薬である Y27632 の投与で見られる細胞形態変化 (d) と同様のものである。(Oishi, A. et al. J Biol Chem. 287, 38705-14 (2012). [文献 33] より転載)

B. ラット cardiac fibroblast に、その RhoGDI $\alpha$  の発現を抑制する siRNA を導入し、同時に G14V の変異を持つ RhoA、さらに wild-type または S174A の変異を持つウシ RhoGDI $\alpha$  を一過性に発現させた。

wild-type のウシ RhoGDI $\alpha$  を発現させた細胞では、コレラ毒素投与による cAMP 濃度上昇で cell rounding が生じている (写真 a と e を比較)。しかし S174A の変異ウシ RhoGDI $\alpha$  を発現させたものでは、cell rounding が生じない (写真 b と f を比較)。(Oishi, A. et al. J Biol Chem. 287, 38705-14 (2012). [文献 33] より転載)

WT : wild-type

Cont : control

GTP-form のまま回収される。この結果、RhoA の活性が低下する」(図 8A)。

しかし細胞においても cAMP 濃度の増加により RhoA がリン酸化され、実際にその機能が抑制されるのかどうかについては意見が分かれていた。「細胞でもこの機序が存在している」とした論文を発表した研究グループがある<sup>35,36)</sup>一方で、この説を提唱した Lang ら自身も含めて<sup>34)</sup>「細胞内では RhoA のリン酸化自体が検出できない」とするグループもあった<sup>37)</sup>。私の研究室でも過去に複数種の細胞で検出を試みたが、内在性の RhoA のリン酸化は確認できなかった。さらに Boltz らの報告では、188 位の Ser のアラニン (Ala) への変換 (S188A) によりリン酸化を受けられない変異 RhoA を発現させた細胞でも、PKA と同様に 188 位の Ser をリン酸化する Protein kinase G (PKG)<sup>24)</sup>により RhoA が抑制されることが観察された<sup>38)</sup>。RhoA は Rho-kinase を介して MYPT-1 (myosin phosphatase targeting subunit-1)をリン酸化し、MLCP (myosin light chain phosphatase)の働きを抑制することで平滑筋の収縮を増強させる (図 3)。Boltz らの行った実験では、この S188A の変異 RhoA を導入した血管平滑筋細胞でも、PKG を活性化させる刺激によりこの平滑筋収縮増強作用が抑制されており、RhoA が抑制されていると解釈できる結果だった。この現象は、RhoA 自身がリン酸化されることでその活性が低下する、という前述の説では説明できない。私の研究室では、14 位のグリシン (Gly) をバリン (Val) に置換して GTPase 活性が低下した変異 (G14V) と前述の S188A の変異を併せ持つ RhoA をラットの心筋線維芽細胞 (cardiac fibroblast) に発現させて実験を行った。この RhoA は GTP の加水分解の低下により GTP-form が維持されて恒常的に活性を示し (恒常活性型変異)、さらにリン酸化を受ける 188 位の Ser が存在しないため、この説に従えば cAMP 濃度を増加させても RhoA は強い活性を維持したままで、cell rounding は生じないはずである。しかしこの cardiac fibroblast は、

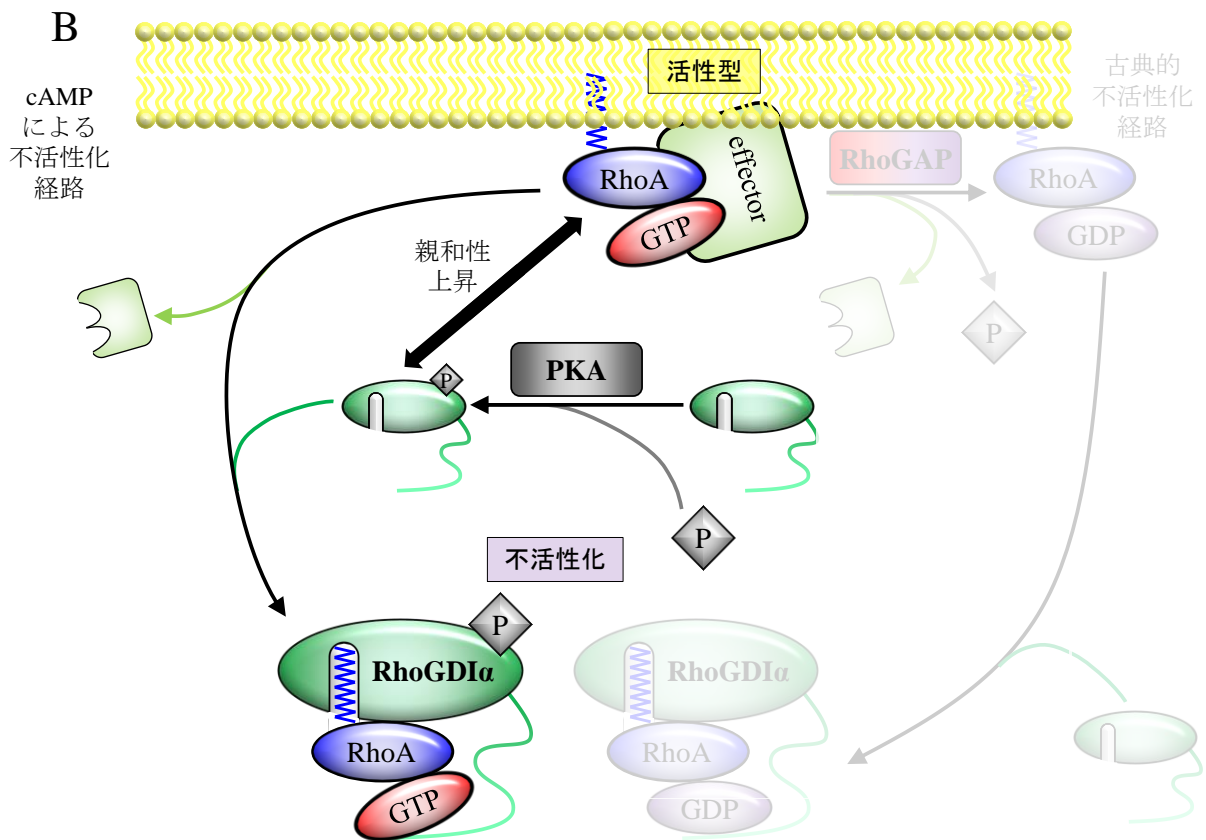
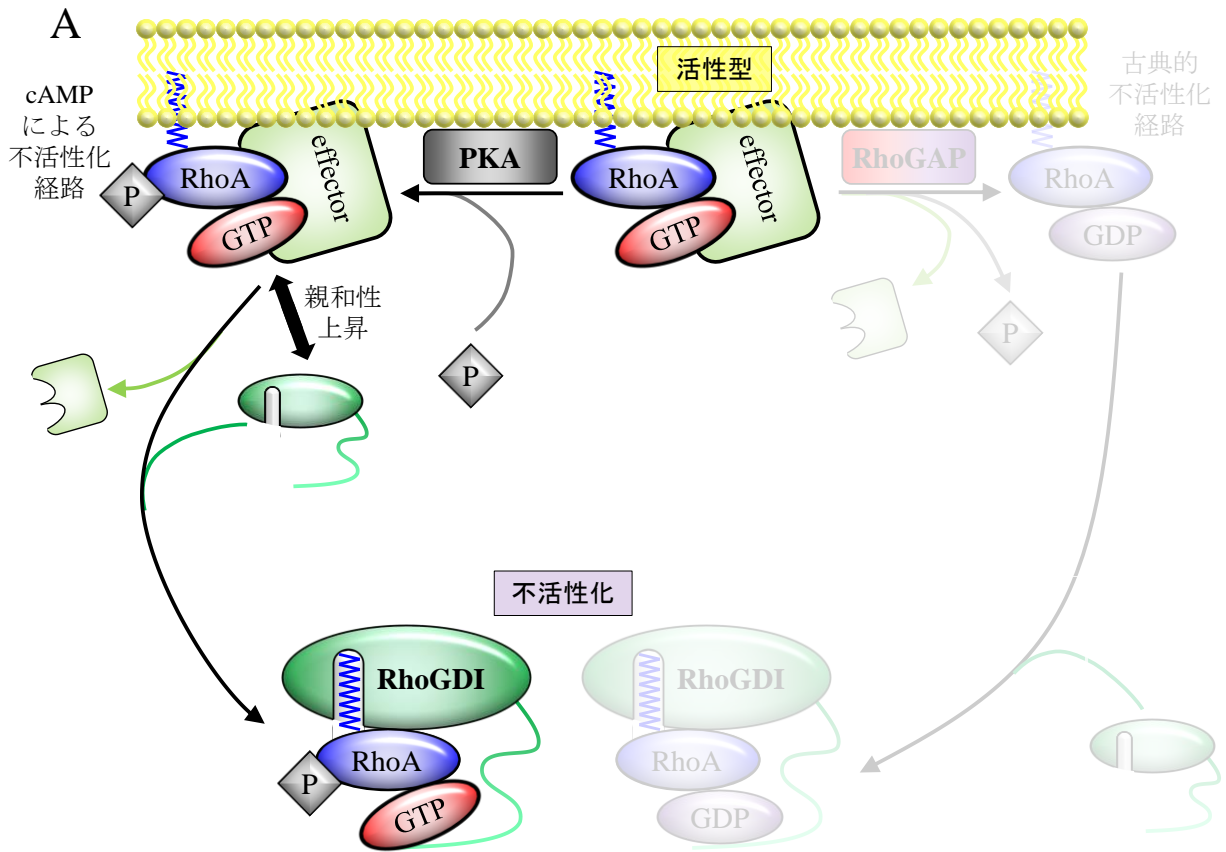


図 8 : cAMP による RhoA の抑制

図 8 : cAMP による RhoA の抑制

A. Lang らによる説。PKA により RhoA がリン酸化されることで、その作用が抑制される。

PKA は、細胞膜に存在する GTP-form の RhoA を選択的にリン酸化する。リン酸化を受けた RhoA は RhoGDI との親和性が増加し、GTP-form のままでも複合体を形成できるようになる。RhoGDI と結合した RhoA は細胞質へ回収されるので、細胞膜に存在する RhoA が減少し、その活性は低下する。(文献 34 を基に作図)

B. 私の研究室より報告した説。PKA により RhoGDI $\alpha$  がリン酸化されることで、RhoA が抑制される。

リン酸化された RhoGDI $\alpha$  は GTP-form の RhoA との親和性が増し、複合体を形成できるようになる。これにより活性化状態の RhoA は、RhoGAP の作用による GTP の加水分解を経ずに GTP-form のまま細胞膜から細胞質へ回収され、その活性が低下する。(文献 33 を基に作図)

cAMP-PKA 系の刺激により cell rounding を生じた。つまり Boltz らの報告<sup>38)</sup>と同じように、RhoA 自身のリン酸化でその活性が抑制されるとする説とは矛盾する結果であった。

そこで視点を変え、細胞において cAMP が RhoA を抑制する機序は別にある可能性について、私の研究室では検討を始めた。Qiao らは、RhoGDI の 1 種である RhoGDI $\alpha$  が、PKA によって 174 位の Ser にリン酸化を受けることを報告し、このリン酸化された RhoGDI $\alpha$  は GTP-form の RhoA との親和性が高まる、との仮説を提唱した<sup>39)</sup>。ただし Qiao らは、細胞においてその仮説の厳密な証明はしていなかった。そこで私の研究室はラットの cardiac fibroblast を用いてそれに取り組んだ。内在性の RhoGDI $\alpha$  の発現を低分子干渉 RNA (small interfering RNA [siRNA]) を用いて抑制し、その siRNA では抑制されないウシの野生型 (wild-type) の RhoGDI $\alpha$  を同時に導入した場合は、cAMP 濃度の増加により cell rounding が生じた。さらに恒常活性型の G14V 変異を加えた RhoA を同時に発現させた場合でも、変わらず cAMP による cell rounding が観察された。この RhoGDI $\alpha$  は cAMP の刺激により 20~30%程度がリン酸化され、その量は細胞膜に存在する RhoA の量より十分に多いこと、そして RhoA との複合体形成が実際に増加していることも確認できた。しかしこの siRNA と、174 位の Ser を Ala に置換してリン酸化を受けられなくした変異 (S174A) を加えたウシの RhoGDI $\alpha$  を、wild-type の RhoGDI $\alpha$  に代えて導入した細胞 (siRNA により内在性の RhoGDI $\alpha$  の発現は 90%以上減少するため、発現している RhoGDI $\alpha$  の大部分は S174A の変異を持つ) では、cAMP 濃度増加による cell rounding が消失した (図 7B)。私の研究室はこれらの結果より、細胞において RhoA が抑制される機序は、RhoGDI $\alpha$  の 174 位の Ser がリン酸化されることによると結論して報告した (図 8B)<sup>33)</sup>。

ただしこの結論は、「細胞においては、cAMP を増加させる刺激で RhoA はリン酸化されない」ということを同時に証明したことにはならない。例えば「RhoA は細胞でもリン酸化されるが、何らかの理由でそれが検出できない、かつそのリン酸化は RhoA の抑制には関与しない」という可能性が考えられるからである。研究室のこれまでの成果から新たに派生した、この「細胞で RhoA のリン酸化が検出できない理由は？」という疑問に今回私は取り組むこととし、その答の仮説として、「リン酸化を受ける RhoA の量が少なく測定系の検出感度未満であるため」、「細胞では RhoA のリン酸化を抑制する仕組みが存在するため」の2つを挙げた。このうち前者の仮説について、「RhoA を過剰に発現させれば、リン酸化を受ける RhoA の量も増え、検出できるようになるのでは」と考えた。そして COS-7 細胞 (アフリカミドリザルの腎の細胞に由来) を用いて緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein [GFP]) タグの付加された RhoA (他の研究室からの提供により入手した RhoA の DNA が、偶然 GFP タグの付いたものであった。この時点で GFP タグに何かの意図を込めていたわけではない。) を過剰発現させ、そのリン酸化が検出されるかを調べる実験を行ったところ、検出することができた。つまり細胞においても、cAMP 濃度の上昇により RhoA のリン酸化は生じ得ることが確認された。

この結果は先に検討した「細胞での RhoA が検出できないのは、リン酸化を受ける RhoA の量が少なく、測定系の検出感度未満であるため」という仮説に矛盾はしないが、真実と証明したわけでもない。なぜならもう1つの「細胞では RhoA のリン酸化を抑制する仕組みが存在するため」という仮説にも矛盾しないからである。例えば「過剰発現させた GFP タグのついた RhoA に内在性の RhoA とは異なる性質が生じ、少なくともその一部がリン酸化を抑制する仕組みから解放された」という説明が可能であ

る。よって仮説の検証には、さらに詳細な検討が必要と考えた。また細胞での cAMP 増加刺激による RhoA の抑制について、それは無細胞系の実験から推測された「RhoA 自身がリン酸化を受けることによる」という機序<sup>34)</sup>ではなくて、「RhoGDI $\alpha$  がリン酸化を受けることによる」という異なる機序で生じると私の研究室より報告した<sup>33)</sup>。しかしリン酸化を受けた RhoA が実際の細胞でも検出できたことを受けて、「では細胞で RhoA がリン酸化を受けることで、細胞にはどのような生物学的作用の変化がもたらされるのだろうか？」というさらに派生した疑問に対しても、その解答を目指すこととした。

## 方法

### 試薬

フォルスコリン (Fsk)、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, Missouri, USA) から購入し、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS) は、Biowest 社 (Galway, Galway, Ireland) から入手した。抗 RhoA 抗体、抗 RhoGDI $\alpha$  抗体、抗ウサギ IgG 抗体は Santa Cruz 社 (Santa Cruz, California, USA) より、抗 Ser188 リン酸化 RhoA 抗体は Abcam 社 (Cambridge, Cambridgeshire, UK) より、抗 GFP 抗体は Medical Biological Laboratories 社 (名古屋市、愛知) より、抗マウス IgG 抗体は Thermo Fisher Scientific 社 (Waltham, Massachusetts, USA) より、それぞれ購入した。アンジオテンシン II (A II) は、Peptide Institute 社 (箕面市、大阪) から購入した。ピタバスタチン (Pita) は興和創薬社 (中央区、東京) より提供を受けた。

### プラスミド DNA の作成

プラスミドは Nucleobond (from Macherey Nagal 社 [Duren, Nordrhein-Westfalen, Germany]) を用いて精製した。GFP タグの付加された RhoA (GFP-RhoA) の DNA は、Tatyana, A. より提供を受けた。GFP-RhoA の変異 (S188A、C190A、G14V) は、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (from Agilent Technologies 社 [Santa Clara, California, USA]) を用いて作成した。

### 細胞の培養と遺伝子導入

COS-7 細胞は、9% (v/v) の FBS を添加した DMEM 培地を用いて、37°C、CO<sub>2</sub> 5%



の環境で培養した。

アデノウイルスによるプラスミド DNA の遺伝子導入は、60 mm ディッシュを用いて行った。このディッシュに COS-7 細胞を  $1.6 \times 10^6$  個撒き、2 時間後に培地を transfection medium (FBS 添加 DMEM 培地 1.3 ml、FBS 不添加 DMEM 培地 0.6 ml、DNA 0.24  $\mu$ g、diethylaminoethyl dextran 216  $\mu$ g、アデノウイルス入り DMEM 培地 0.8 ml) に置換し、同じ 37°C、CO<sub>2</sub> 5% の環境に置いた。さらに 2 時間後、培地を吸引廃棄して dimethylsulfoxide (DMSO) 混合 (最終濃度 10% [v/v]) カルシウム・マグネシウム不含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-) [和光純薬社、大阪市、大阪より購入]) で 1 回洗浄し、FBS 添加 DMEM 培地を加えて引き続き培養した<sup>40,41)</sup>。

#### cAMP による RhoA のリン酸化

遺伝子導入した COS-7 細胞を、その 6 時間後に 60 mm ディッシュから 12 穴プレートへ 1 穴当たり  $0.4 \times 10^6$  個で撒き直した。18 時間後に FBS 添加 DMEM 培地を FBS 不添加のものに交換し、さらに 24 時間後に 200  $\mu$ l の Laemmli sample buffer で細胞を破碎した。cAMP による RhoA のリン酸化は、Fsk を細胞破碎の 1 時間前に最終濃度 100  $\mu$ M となるように各穴に加えることで行った。同様に Pita の前処置は 10  $\mu$ M、24 時間、A II の刺激は 100 nM、1 時間でそれぞれ行った (これらの条件は、刺激濃度・時間の基礎検討や、他論文での実験条件を参考に決定した。)。回収した試料は 10 分間煮沸し、ウエスタンブロッティング (western blotting) に用いた。

## 親水性タンパク質と疎水性タンパク質の分離 (phase separation assay)

遺伝子導入した COS-7 細胞を、その 6 時間後に 60 mm ディッシュから 6 穴プレートへ 1 穴当たり  $0.8 \times 10^6$  個で撒き直した。18 時間後に FBS 添加 DMEM 培地を FBS 不添加のものに交換した。試薬は前項で説明したものと同様に投与した。24 時間後に FBS 不添加 DMEM 培地を吸引廃棄して lysis buffer A (50 mM HEPES [pH 8.0]、150 mM NaCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、150 mM  $\beta$ -mercaptoethanol、1% Triton X-114) 260  $\mu$ l を氷上で加えて細胞を破碎し、2 ml マイクロチューブに移した。4°C、800 g、5 分の遠心分離を行い、上清を新たな 2 ml マイクロチューブに移して再度遠心分離した。上清に separation buffer (50 mM HEPES [pH 8.0]、150 mM NaCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、150 mM  $\beta$ -mercaptoethanol、0.1% Triton X-114、6% [w/v] sucrose) 300  $\mu$ l を加え、37 °C の恒温槽に 3 分間置き、37°C、400 g で 4 分遠心分離した。その上層を水相 (aqueous phase) 由来の試料、下層を界面活性剤相 (detergent phase) 由来の試料とした (図 9)。

aqueous phase 由来の試料には、30  $\mu$ l の 10% TritonX-114 を加えて、37°C の恒温槽に 3 分間に置き、37°C、400 g、4 分の遠心分離を行って再度上層と下層に分離させた。これを 3 回繰り返す、親水性タンパク質の純度を高めた。一方 detergent phase 由来の試料には、separation buffer を 200  $\mu$ l ずつ加えて、前述の aqueous phase 由来の試料に行ったものと同様の操作を 3 回行って、疎水性タンパク質の純度を高めた。

その後に aqueous phase 由来の試料からは 76  $\mu$ l を取って、2.5 倍濃縮 Laemmli buffer 20  $\mu$ l と 10% Triton X-114 4  $\mu$ l と混ぜ、一方 detergent phase 由来の試料からは、その 4  $\mu$ l と 2.5 倍濃縮 Laemmli buffer 20  $\mu$ l、separation buffer 76  $\mu$ l を混合し、それぞれの最終試料とした。これらを 10 分間煮沸した後に、western blotting に使用した<sup>42,43)</sup>。

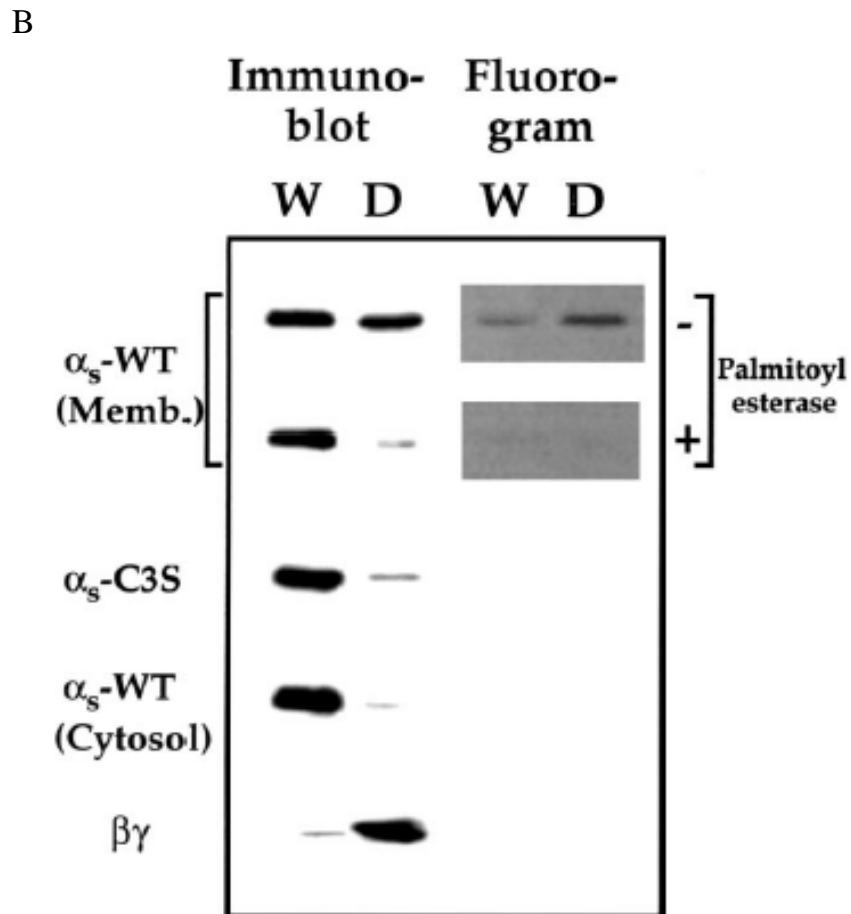
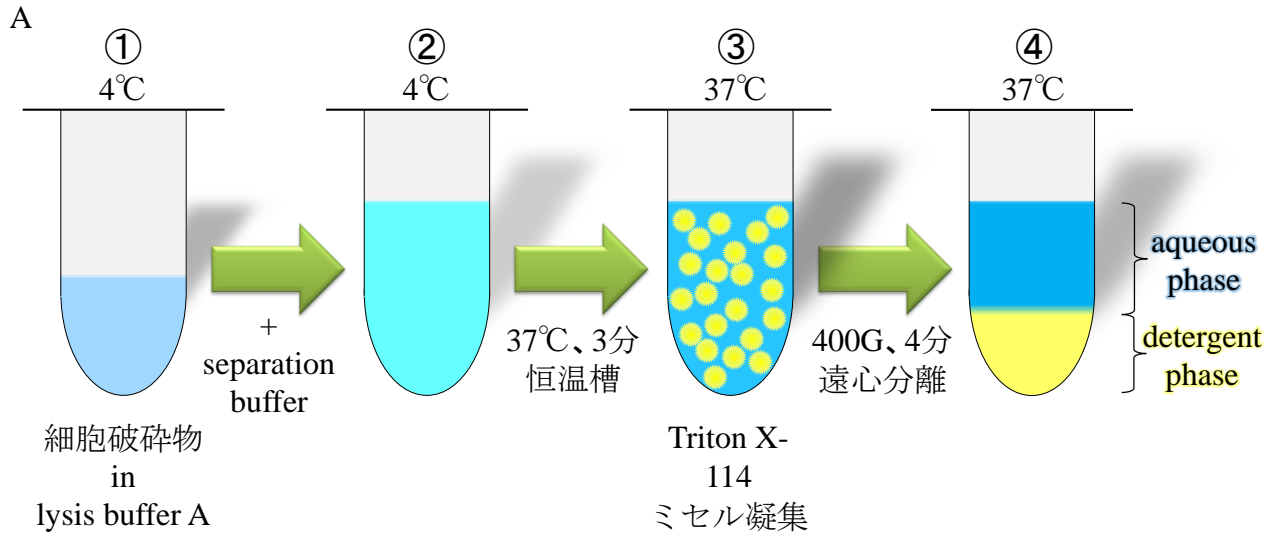


図 9 : phase separation assay

図 9 : phase separation assay

A. phase separation assay の原理。

細胞を、1% Triton X-114 (非イオン性界面活性剤、限界ミセル濃度 0.01%) を含む氷冷した lysis buffer A で破碎して、タンパク質を回収する (①)。そこへ 0.1% の Triton X-114 を含有する separation buffer を加える (②)。そして 37°C の恒温槽に 3 分間浸けると、Triton X-114 の曇点 (clouding point : ミセルの凝集が生じる温度) である約 23°C を超えるためミセルの凝集が生じ、液体の透光性が低下する (③)。さらに 400 g で 4 分間遠心分離すると、凝集したミセルが沈殿し、透明な上層 (aqueous phase) と透光性の低い下層 (detergent phase) に分離する (④)。親水性タンパク質は上層の aqueous phase に、疎水性タンパク質は Triton X-114 と親和性を持つため共に沈殿して下層の detergent phase に、それぞれ分布する。

B. phase separation assay による親水性タンパク質と疎水性タンパク質の分離の例。

ヘテロ三量体 G タンパク質である  $G_s$  の  $\alpha$  サブユニットは、脂肪酸のパルミチン酸による修飾を受ける。palmitoyl esterase でその修飾を除去したもの ( $\alpha$ s-WT (Memb.) Palmitoyl esterase + [2 段目]) や、修飾を受けない変異  $G_s\alpha$  ( $\alpha$ s-C3A [3 段目]) は、親水性となり、water phase にほぼ全量が検出される。一方  $G_s$  の  $\beta\gamma$  サブユニットは、RhoA と同じく prenylation を受けるタンパク質であるため疎水性となり、detergent phase に大部分が検出される ( $\beta\gamma$  [5 段目])。この実験結果は、本文で説明した phase separation assay の手法により、脂肪鎖を持たない親水性タンパク質と、それを持つ疎水性タンパク質とを高い精度で分離できることを証明しており、今回の実験でこの手法を用いることとした。(Iiri, T., et al. Proc Natl Acad Sci USA. 93, 14592-7 (1996). [文献 43] から転載、Copyright (1996) National Academy of Sciences, USA.)

W : water phase (水相)

D : detergent phase (界面活性剤相)

## 細胞膜に存在するタンパク質と細胞質に存在するタンパク質の分離 (membrane localization assay)

COS-7 細胞を  $4 \times 10^6$  個の量で 100 mm ディッシュに撒いた。24 時間後、FBS 添加 DMEM 培地を FBS 不添加のものに交換し、さらに 48 時間後にその DMEM 培地を吸引除去して 4°C に冷やした PBS (-) を加えて細胞を回収した。4°C、400 g、5 分の条件で遠心分離を行い、上清を廃棄して hypotonic buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、20 mM NaCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EGTA、proteinase inhibitors) を加えて細胞を破碎した。10 分後、ダウンス型ホモジナイザーで 15 回の破碎を追加し、残存する未破碎細胞や核成分は 4°C、800 g、5 分の遠心分離で沈殿させた。上清はさらに超遠心分離 (4°C、160000 g、30 分) を行い、その上清を細胞質分画とした。沈渣は lysis buffer B (40 mM Tris-HCl [pH 7.5]、100 mM NaCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EGTA、1% Triton X-100、proteinase inhibitors) を加えて 4°C の環境に 1 時間置いて溶解させた後に 200 g、5 分の遠心分離を行い、その上清を細胞膜分画とした。両分画にはそれぞれの回収量と同量の Laemmli sample buffer を加え、5 分間煮沸した後に western blotting に使用した<sup>33)</sup>。

## リン酸化 RhoA の精製

野生型 (wild-type) の GFP-RhoA (GFP-RhoA WT) を導入した COS-7 細胞に Fsk を投与して、phase separation assay を実施した。その aqueous phase 由来の試料 (後述の図 14C の lane 4 に相当) から、リン酸化タンパク質吸着カラムとして PhosphoProtein Purification Kit (from Qiagen 社 [Venlo, Limburg, Netherlands]) を用いて、リン酸化修飾を持つタンパク質を抽出した (図 10)。この試料に含まれる GFP-RhoA WT は、全てリ

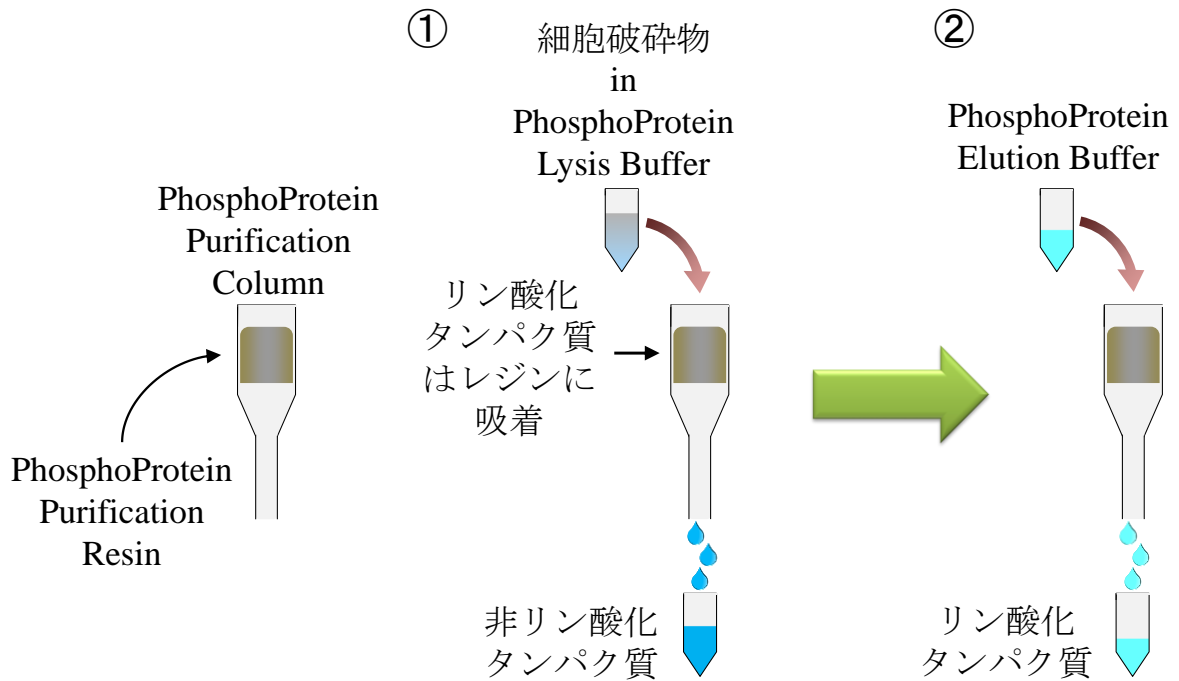


図 10：リン酸化吸着カラムによるリン酸化 RhoA の精製

アフィニティクロマトグラフィの原理により、リン酸化されたアミノ酸を含むタンパク質とリン酸化アミノ酸を持たないタンパク質を分離する。

カラムにはリン酸化されたタンパク質と親和性を持つレジン (PhosphoProtein Purification Resin) が装填されている (左)。PhosphoProtein Lysis Buffer を用いて細胞破砕物を回収し、タンパク質濃度を 0.1 mg/ml に調整してカラムに流すと、リン酸化されたタンパク質はレジンに吸着され、リン酸化を受けていないタンパク質は流出する (①)。その後、リン酸化タンパク質をレジンから溶出する PhosphoProtein Elution Buffer (50 mM NaCl、9 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、41 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.25% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate [CHAPS]) を流すと、リン酸化タンパク質が流出してくる (②)。(PhosphoProtein Purification Kit の使用マニュアル [from Qiagen 社] を基に作図)

ン酸化を受けていると想定した。

### 共免疫沈降法

遺伝子導入した COS-7 細胞を、その 6 時間後に 60 mm ディッシュから 6 穴プレートへ 1 穴当たり  $0.8 \times 10^6$  個で撒き直した。18 時間後に FBS 添加 DMEM 培地を FBS 不添加のものに交換した。48 時間後に FBS 不添加 DMEM 培地を吸引廃棄して、氷冷した PBS (-) で洗浄し、immunoprecipitation buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5]), 40 mM NaCl、10 mM EGTA、10 mM ピロリン酸 Na、100 mM NaF、1 mM DTT、1% Triton X-100、proteinase inhibitors) で細胞を破碎して、4°C の環境に 1 時間置いた。その後 4°C、15000 rpm、10 分の遠心分離を行い、上清を 1.5 ml マイクロチューブに移し、そこへ抗 GFP 抗体を 1  $\mu$ g 加え、引き続き 4°C で 1 時間振盪した。続いて 50% のプロテイン G を含む 20  $\mu$ L のゲル懸濁液を加え、振盪しながら 4°C の環境でさらに 1 時間置いた。immunoprecipitation buffer で 3 回洗浄 (1 ml の buffer を加えて 4°C で 10 分間振盪し、続いて 400 g で 1 分間遠心分離し、上清を廃棄) し、その後 20  $\mu$ L の immunoprecipitation buffer と 35  $\mu$ L の Laemmli sample buffer を加え、よく混和した後に 5 分煮沸した。そして室温、15000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清を回収し、western blotting に用いた。

### SDS-PAGE によるタンパク質分離と western blotting

作成した試料は、12% ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis [SDS-PAGE]) によってタンパ

ク質をその分子量に基づいて分離し、120 mA、90 分の条件でゲルから polyvinylidene fluoride (PVDF) メンブレンへ転写した。メンブレンは blocking buffer (1% [w/v] 脱脂粉乳、0.2% Tween 20、144 mM NaCl、2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.02% NaN<sub>3</sub>) に浸して 1 時間室温で振盪した後に、各 1 次抗体と 4°C で一晩反応させた (抗 RhoA 抗体 1:1000、抗 Ser188 リン酸化 RhoA 抗体 1:500、抗 GFP 抗体 1:10000、抗 RhoGDI $\alpha$  抗体 1:1000、それぞれ blocking buffer で希釈)。

1 次抗体希釈液を廃棄し、メンブレンを、Tween-20 を混合した PBS (PBS-T : 0.2% Tween 20、144 mM NaCl、2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) で洗浄し、引き続き 2 次抗体と室温下で 1 時間反応させた (抗マウス IgG 抗体 1:15000、抗ウサギ IgG 抗体 1:10000、それぞれ PBS-T で希釈)。2 次抗体希釈液を廃棄後、メンブレンを PBS-T、続いて PBS (144 mM NaCl、2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) で 3 回ずつ洗浄 (室温で 10 分間ずつ振盪) し、ECL Western Blotting Detection Reagents (from GE healthcare 社 [Fairfield, Connecticut, USA]) を用いてフィルムに現像した。



## 結果

### PKA は細胞内で RhoA の 188 位の Ser をリン酸化する

COS-7 細胞に野生型の GFP-RhoA (GFP-RhoA WT) を、アデノウイルスを用いて一過性に過剰発現させた。これに cAMP-PKA 系を活性化する目的で、アデニル酸シクラーゼを直接活性化するフォルスコリン (Fsk) を投与し、細胞全体のタンパク質を回収して western blotting を行った。1 次抗体に抗 RhoA 抗体を用いたもの (図 11A 上) では、GFP-RhoA WT を過剰発現させたもので、内在性の RhoA (図 11A 上 lane 3、4 の内在性 RhoA) に加えて、その GFP-RhoA WT も発現していることが確認された (図 11A 上 lane 3、4 の GFP-RhoA)。1 次抗体に抗 Ser188 リン酸化 RhoA 抗体を用いた western blotting (図 11A 下) では、Fsk を投与しないものでも GFP-RhoA WT のリン酸化が検出され、Fsk によりそれがさらに増加することが観察された (図 11A 下 lane 3 と 4 の GFP-RhoA を比較)。なお Fsk を投与せずとも検出された GFP-RhoA WT のリン酸化 (図 11A 下 lane 3 の GFP-RhoA) は、cAMP の刺激を受けていない基底状態の PKA、あるいは RhoA をリン酸化する別のキナーゼ (PKG など)<sup>24)</sup>が持つ僅かなリン酸化活性によるものと推測される。一方で内在性の RhoA は、その発現は確認できる (図 11A 上 lane 1~4 の内在性 RhoA) にも関わらず、リン酸化は検出できなかった (図 11A 下 lane 1~4 の内在性 RhoA)。

同様に COS-7 細胞に GFP-RhoA S188A (188 位の Ser を、リン酸化を受けない Ala に置換した変異) を過剰発現させて Fsk を投与した (図 11B)。するとそのリン酸化は検出されなかった (図 11B 下 lane 5~8)。この結果より、今回の実験で用いた抗 Ser188 リン酸化 RhoA 抗体が、188 位の Ser のリン酸化を特異的に認識すること、また GFP

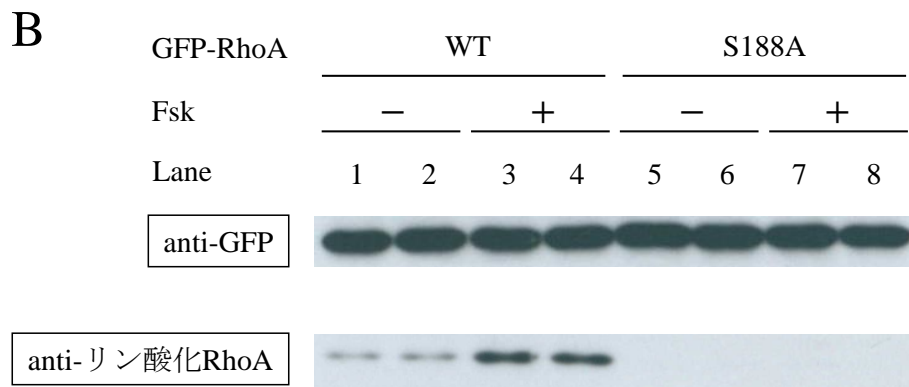
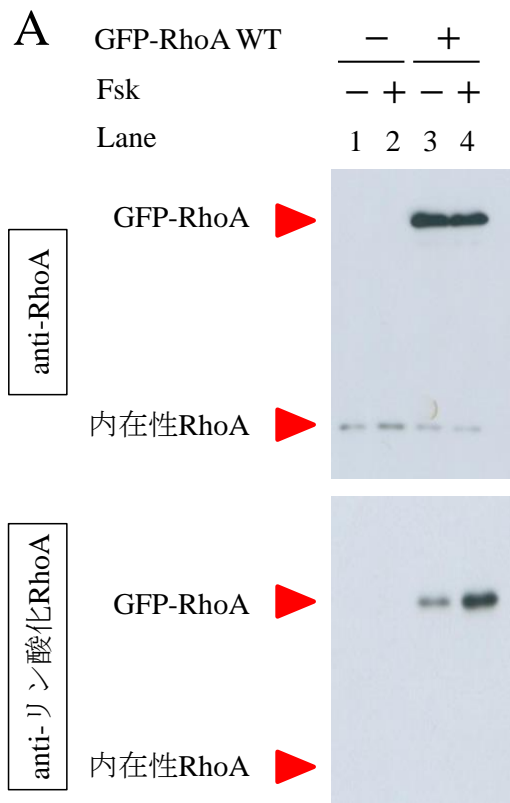


図 11 : 過剰発現させた GFP-RhoA のリン酸化

C

|         |   |   |    |    |    |    |    |     |     |
|---------|---|---|----|----|----|----|----|-----|-----|
| Fsk (分) | 0 | 5 | 15 | 30 | 45 | 60 | 90 | 120 | 180 |
| Lane    | 1 | 2 | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8   | 9   |

anti-リン酸化RhoA



D

|             |   |   |   |   |
|-------------|---|---|---|---|
| GFP-RhoA WT | - |   | + |   |
| Fsk         | - | + | - | + |
| Lane        | 1 | 2 | 3 | 4 |

anti-RhoA

GFP-RhoA

内在性RhoA



anti-リン酸化RhoA

GFP-RhoA

内在性RhoA



図 11 : 過剰発現させた GFP-RhoA のリン酸化

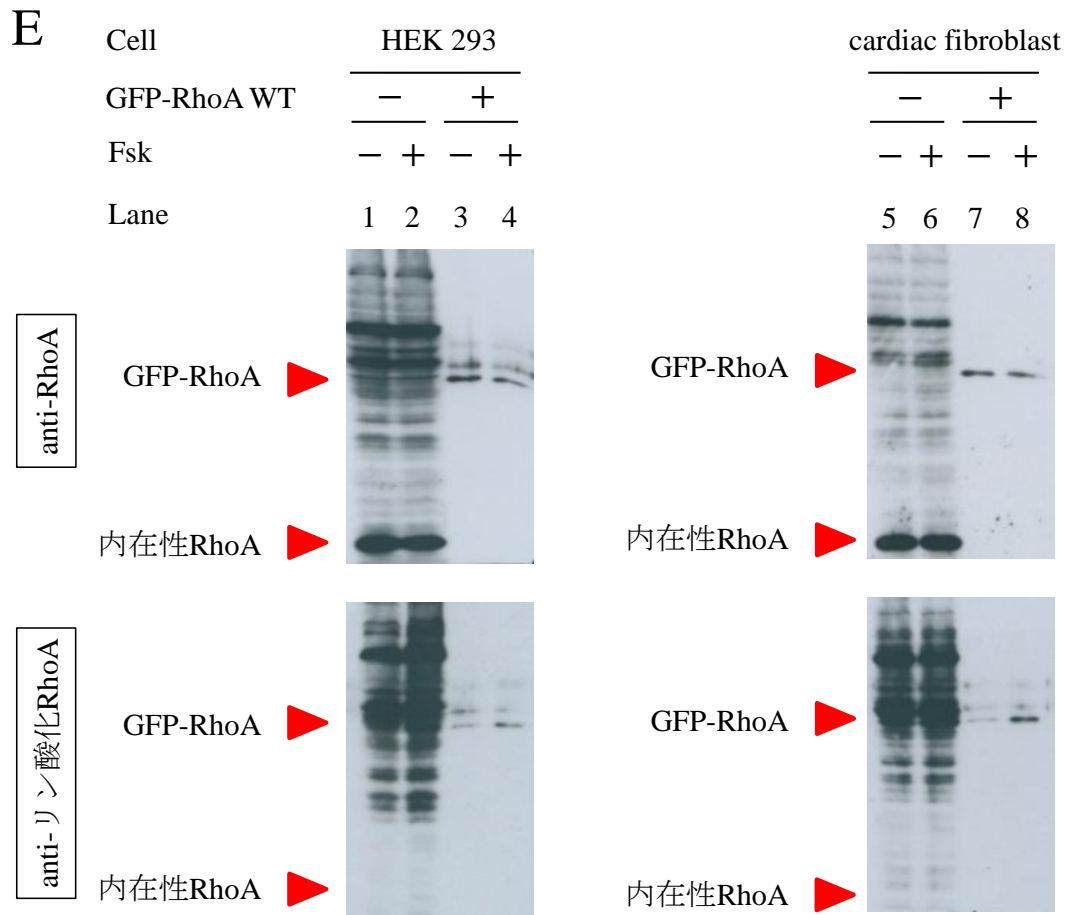


図 11 : 過剰発現させた GFP-RhoA のリン酸化

### 図 11：過剰発現させた GFP-RhoA のリン酸化

A. COS-7 細胞にベクターDNA、GFP-RhoA WT を、それぞれアデノウイルスを用いて導入した。Fsk の刺激は 100  $\mu$ M、1 時間で行い、RhoA のリン酸化を western blotting で検討した。GFP-RhoA (約 48 kDa) は、内在性の RhoA (約 21 kDa) より泳動が遅いため、上方に離れて検出される。

B. 同様に GFP-RhoA S188A を発現させ、そのリン酸化を調べた。実験は各試料を 12 穴プレートで 2 穴ずつ作成して行い、それぞれを異なる lane で SDS-PAGE を行った。

C. COS-7 細胞に GFP-RhoA WT を過剰発現させ、Fsk の投与時間を様々に変え、リン酸化の検出に適した条件を western blotting で検討した。濃度は 100  $\mu$ M に固定している。

D. 図 A の lane 3、4 の試料を 40 倍に希釈し、lane 1、2 の試料はそのままの濃度で、western blotting を再度施行した。フィルムの露光時間は、図 A のものよりも長くしている。

E. HEK 293 細胞とラット cardiac fibroblast それぞれで、図 D で COS-7 細胞を用いて行ったものと同様に実験を行った。左の HEK 293 細胞の実験では lane 3、4 の試料は、その GFP-RhoA WT の量が lane 1、2 の内在性 RhoA の量より少なくなるように、右の cardiac fibroblast の実験では、lane 7、8 の試料を、その GFP-RhoA WT の量が lane 5、6 の内在性 RhoA のものより少なくなるようにそれぞれ希釈している。

タグの存在が、PKA によるこの 188 位の Ser のリン酸化に影響を与えないことを確認した。

また、GFP-RhoA WT のリン酸化を western blotting で検出するのに適した Fsk の投与時間・濃度の検討を行った。他の研究グループの実験条件 (投与濃度 1~25  $\mu\text{M}$ 、投与時間 20~120 分)<sup>35,39,44,45)</sup>を参照して、投与濃度をそれらより高い 100  $\mu\text{M}$  に固定し、投与時間を様々に変えてリン酸化を検出した (図 11C)。その結果からは、45~90 分にかけて (図 11C lane 5~7) リン酸化が最も強く検出されることが判明した。一方濃度についての検討ではこの 100  $\mu\text{M}$  であれば十分と考え、実験で投与する Fsk の条件は、100  $\mu\text{M}$ 、1 時間とすることとした。

図 11A で内在性の RhoA のリン酸化が検出されない理由は、「その発現量が少ないためにリン酸化された量も少なく、抗 Ser188 リン酸化 RhoA 抗体を用いて行った western blotting ではその検出感度未満であったため」とのこの実験で検証を試みた仮説で説明できる。一方で、「過剰発現させた GFP-RhoA WT には、内在性 RhoA とは異なる性質があり、その性質のために前者がリン酸化を受けやすくなっている」という仮説もやはり成立し得る。どちらの仮説が確からしいのかを検討するために、GFP-RhoA WT を過剰発現させた細胞の試料 (図 11A の lane 3 と 4 の試料) を 40 倍に希釈して、GFP-RhoA WT の濃度が、ベクターDNA を導入した細胞の試料 (図 11A の lane 1 と 2 の試料) の内在性 RhoA の濃度より低くなるようにした (図 11D 上、lane 1、2 の内在性 RhoA と、lane 3、4 の GFP-RhoA を比較)。そしてそのように希釈した試料で、抗 Ser188 リン酸化 RhoA 抗体を 1 次抗体に用いた western blotting を再度行った (図 11D 下)。GFP-RhoA WT は、そのように希釈してもなおリン酸化を検出できた (図 11D 下 lane 4 の GFP-RhoA)。内在性の RhoA が、GFP-RhoA WT と同程度にリン酸化され

るのであれば、より量の少ない GFP-RhoA WT のリン酸化が検出できているので、内在性の RhoA のリン酸化も検出できるはずである。しかし内在性の RhoA のリン酸化は検出できないままだった (図 11D 下 lane 1、2 の内在性 RhoA)。この結果より、内在性の RhoA のリン酸化が検出できない理由を、その量が少ないということには求められないこと、過剰発現させた GFP-RhoA WT のリン酸化が検出されたのは、内在性の RhoA と比べてリン酸化を受けやすい性質を持っているからであること、が推定された。

さらに他の細胞でも同様なのかを調べるため、HEK 293 細胞とラット cardiac fibroblast を用いて、COS-7 細胞で行った図 11D の実験と同様のものを行った (図 11E)。この両者への GFP-RhoA WT の一過性の発現は、Lipofectamine 2000 (from Thermo Fisher Scientific 社) を用いて、その標準プロトコルに従って行った。その結果は COS-7 細胞のものと同じで、GFP-RhoA WT のリン酸化は検出された (図 11E 下 lane 3、4、7、8 の GFP-RhoA) が、GFP-RhoA より量が多い内在性の RhoA (図 11E 上 lane 1、2 の内在性 RhoA と lane 3、4 の GFP-RhoA、lane 5、6 の内在性 RhoA と lane 7、8 の GFP-RhoA をそれぞれ比較) のリン酸化は検出できなかった (図 11E 下 lane 1、2、5、6 の内在性 RhoA)。

unprenylated-RhoA は、prenylated-RhoA よりも cAMP の刺激でリン酸化されやすい

過剰発現させた GFP-RhoA WT が、内在性の RhoA よりもリン酸化されやすい性質を持っているという推定が得られたことを受けて、その性質の違いと関連するものの候補の 1 つとして、RhoA の翻訳後修飾である prenylation を挙げ、その阻害により

ン酸化が変化するかどうかを調べた。まず GFP-RhoA C190A (190 位の Cys を Ala へ置換することで、prenylation が生じなくなる変異) をアデノウイルスで COS-7 細胞に一過性に過剰発現させた。すると GFP-RhoA C190A は、GFP-RhoA WT に比較して PKA によるリン酸化が増加するという結果が得られた (図 12A 下 lane 2 と 4 を比較)。

次に GFP-RhoA WT を過剰発現させた COS-7 細胞に、prenylation を阻害する作用を持つ可能性が示唆されているスタチンの 1 種であるピタバスタチン (Pita) を投与して、細胞内 cAMP 濃度上昇による RhoA のリン酸化が変化するかを調べた。スタチンは高 LDL コレステロール血症の治療薬として臨床使用されており、その作用は、コレステロールの合成経路であるメバロン酸カスケードの律速酵素となっている 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase を阻害することで発揮される。prenylation に利用されるゲラニルゲラニル基の供給源となるゲラニルゲラニルピロリン酸 (図 5) もこのカスケードに含まれているため、スタチンは副次的にその合成も抑制することになり、prenylation を阻害する作用も持つことが示唆されていた (図 13)<sup>46,47)</sup> (Pita が prenylation を抑制することは、後述の図 14D の実験で確認した)。

Pita を投与すると、その単独投与で GFP-RhoA のリン酸化は増加し (図 12B 下 lane 1 と 3 の GFP-RhoA を比較)、Fsk を加えることでそれはさらに増加した (図 12B 下 lane 3 と 4 の GFP-RhoA を比較)。また同じ Pita の前処理により、cAMP 増加の刺激による内在性 RhoA のリン酸化も認められるようになった (図 12B 下 lane 4 の内在性 RhoA)。

以上の 2 つの実験結果は共に、非プレニル化 RhoA (unprenylated-RhoA) は、プレニル化 RhoA (prenylated-RhoA) よりも cAMP によるリン酸化を受けやすいということを示唆した。



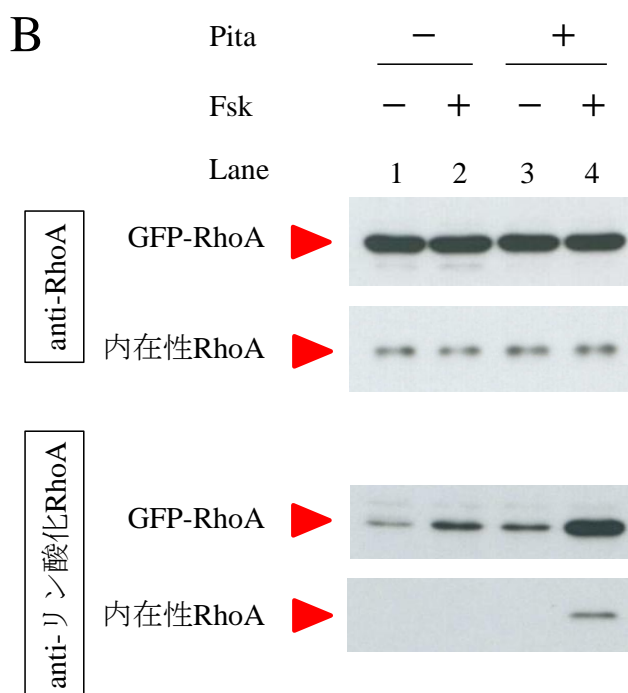
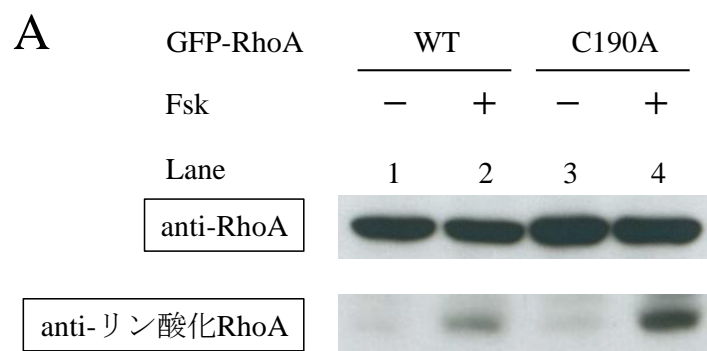


図 12 : PKA による unprenylated-RhoA の選択的リン酸化

A. GFP-RhoA WT または GFP-RhoA C190A を、アデノウイルスを用いて COS-7 細胞に過剰発現させた。Fsk は 100  $\mu$ M の濃度で 1 時間投与し、GFP-RhoA のリン酸化を western blotting で検討した。

B. GFP-RhoA WT を過剰発現させた COS-7 細胞に、Pita (10  $\mu$ M、24 時間)、Fsk (100  $\mu$ M、1 時間) を投与し、GFP-RhoA と内在性 RhoA のリン酸化を検討した。

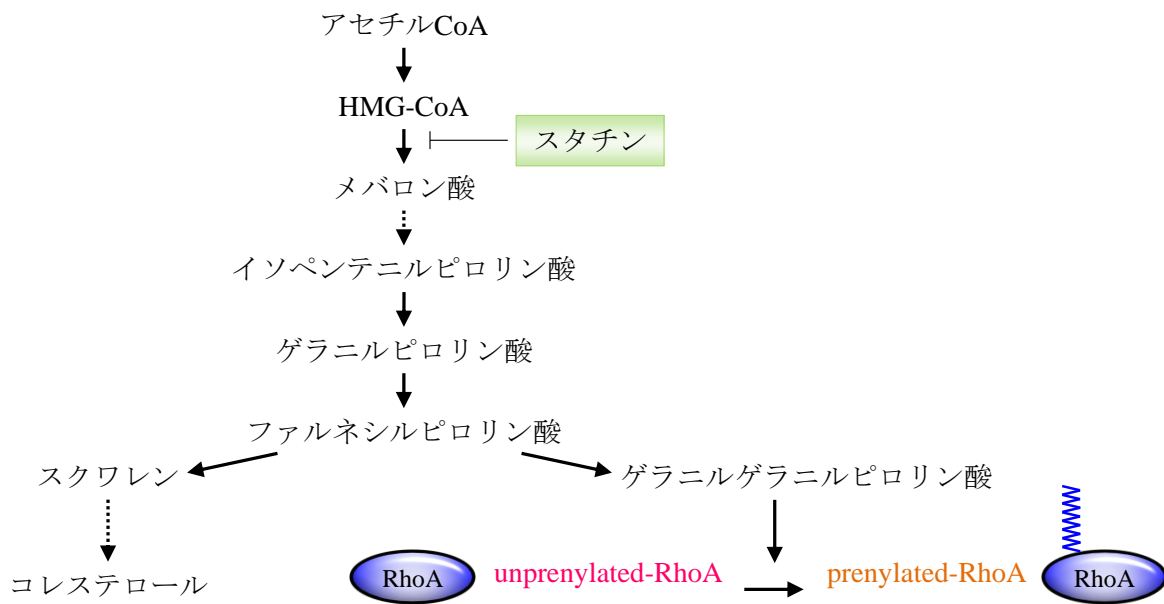


図 13 : メバロン酸カスケード

コレステロールは、アセチル CoA からメバロン酸カスケードを経て合成される。スタチンは、このカスケードの律速酵素である HMG-CoA reductase を阻害してメバロン酸の生成を抑制することで、コレステロールの合成を抑制する。このカスケードからは、prenylation に利用されるファルネシルピロリン酸やゲラニルゲラニルピロリン酸も生成される。よってスタチンはそれらの合成も抑制し、RhoA も含めて低分子量 G タンパク質の prenylation を阻害する可能性が指摘されていた。

内在性 RhoA と過剰発現させた GFP-RhoA では、prenylated-form と unprenylated-form の存在比率が異なる

COS-7 細胞において、cAMP-PKA 系によるリン酸化への感受性が異なることが推定された prenylated-RhoA と unprenylated-RhoA の存在比率を検討した。非イオン性の界面活性剤である Triton X-114 を用いた phase separation assay で、細胞破砕物を、疎水性タンパク質を含む detergent phase の試料と、親水性タンパク質が分配される aqueous phase の試料に分離した。prenylated-RhoA は脂肪鎖であるゲラニルゲラニル基の結合により疎水性を示すため detergent phase に、unprenylated-RhoA はそれがなく親水性であるために aqueous phase に分配される。結果は、内在性の RhoA は detergent phase のみに検出され (図 14A 上 lane 1)、つまりほとんど全てが翻訳後修飾の prenylation を受けた形 (prenylated-form) で存在し、prenylation を受けていないもの (unprenylated-form) はほとんど存在しないと考えられた。

また超遠心法により、細胞破砕物を細胞膜分画と細胞質分画に分離して内在性 RhoA の局在を調べた (図 14B) ところ、そのほとんどが RhoGDI $\alpha$  とともに細胞質分画に認められた (図 14B lane 2)。その比率を定量するために細胞質分画の試料を様々な割合で希釈して western blotting を行い、細胞膜分画のものと比較した。細胞膜分画の RhoA (図 14B lane 3) の量は、細胞質分画の試料を 10 倍に希釈したもの (図 14B lane 6) と 25 倍に希釈したもの (図 14B lane 7) の間であった。さらにこの 3 者をデンシトメトリ (ImageJ [from National Institutes of Health (Bethesda, Maryland, USA)]) を用いて定量して比較すると、細胞膜分画の RhoA の量は、細胞質分画の試料を 20 倍希釈したものにほぼ相当した。これより RhoA は、細胞膜と細胞質におよそ 1:20 の比率

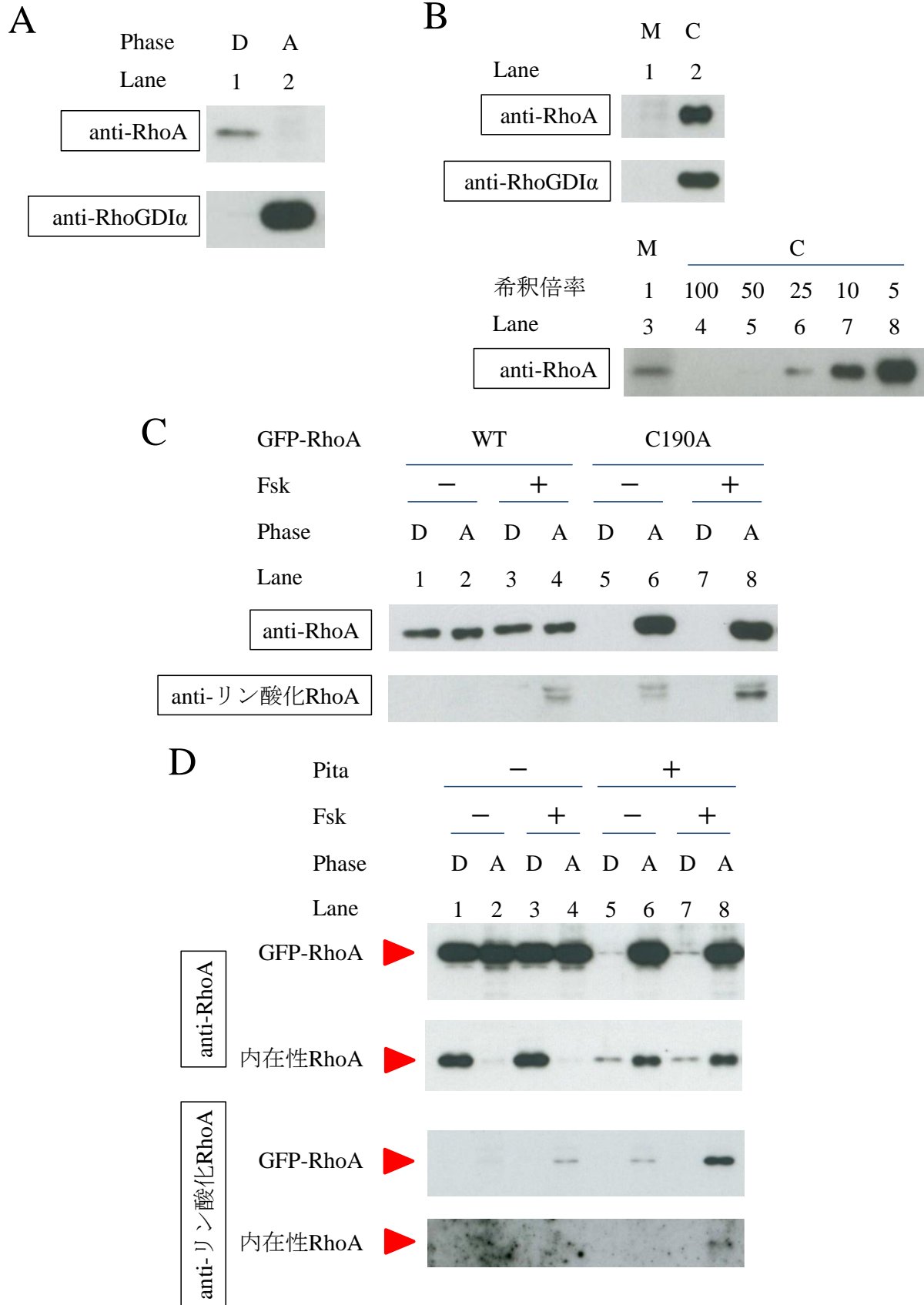


図 14 : prenylated-RhoA と unprenylated-RhoA の存在比率



で存在していると算出された。

以上より内在性 RhoA の約 95%は、prenylation を受けて細胞質に存在していると考えられた。この結果は、RhoA の 90%以上は RhoGDI と複合体を形成して細胞質に存在しているとする過去の報告<sup>35,47,48</sup>)に合致する。ところで phase separation assay では、RhoA は detergent phase、RhoGDI $\alpha$  は aqueous phase と、両者は異なる相に分配された (図 14A 上 lane 1 と下 lane 2)。RhoA と RhoGDI $\alpha$  の複合体は、疎水性を示す RhoA のゲラニルゲラニル基が RhoGDI $\alpha$  により覆われて露わにならないため、aqueous phase に分布すると考えられる。そうであれば、RhoA も aqueous phase に検出されるはずである。しかし実際には、RhoA は detergent phase にのみ検出された。その理由は、phase separation assay の操作の過程で、RhoA と RhoGDI $\alpha$  の複合体のほぼ全てが解離するためと推測している。

一方、GFP-RhoA WT を過剰発現させた COS-7 細胞で同様に phase separation assay を行い、それが 2 つの相にどのように分配されるかを調べた (図 14C)。その結果、GFP-RhoA WT の両相への分配には大きな差がなく、prenylated-form と unprenylated-form が共に存在していると考えられた (図 14C 上 lane 1、3 と 2、4 を比較)。そして PKA による RhoA のリン酸化は、Fsk を投与したものの aqueous phase でのみ認められ (図 14C 下 lane 4)、同程度の量の RhoA が存在する detergent phase では検出されなかった (図 14C 下 lane 3)。また prenylation を受けない変異である GFP-RhoA C190A を過剰発現させると、それは detergent phase には分配されず (図 14C 上 lane 5、7)、aqueous phase のみに分布しており (図 14C 上 lane 6、8)、親水性の unprenylated-form は aqueous phase に高い精度で選択的に分配されることが確認された。そのリン酸化は Fsk の投与がなくても検出され (図 14C 下 lane 6)、その投与によりさ

らに増加した (図 14C 下 lane 8)。以上の結果から、PKA による RhoA のリン酸化は、aqueous phase に分配される unprenylated-form に選択的に生じると考えられた。

続いて GFP-RhoA WT を過剰発現させた COS-7 細胞に Pita を投与して同様に phase separation assay を行い、その効果を調べた (図 14D)。Pita により、GFP-RhoA WT では detergent phase の prenylated-form が減少して aqueous phase の unprenylated-form が増加し、後者が優位となった (図 14D 上 lane 1~4 と 5~8 の GFP-RhoA を比較)。一方内在性 RhoA は、Pita の投与がなければ図 14A と同じく detergent phase にのみ分布していた (図 14D 上 lane 1~4 の内在性 RhoA)。ところが Pita を投与すると、むしろ aqueous phase に多く分配されるようになった (図 14D 上 lane 5~8 の内在性 RhoA)。つまり Pita の投与により、GFP-RhoA WT、内在性 RhoA とともに prenylated-form が減少して unprenylated-form が増加しており、Pita が prenylation を阻害することが確認された。GFP-RhoA WT のリン酸化は、Pita による unprenylated-form の増加に伴い増加し (図 14D 下 lane 2 と 6、4 と 8 の GFP-RhoA をそれぞれ比較)、そして僅かではあるが内在性 RhoA のリン酸化も、Pita・Fsk の両剤投与下の aqueous phase で検出された (図 14D 下 lane 8 の内在性 RhoA)。detergent phase でリン酸化が検出できないこと (図 14D 下 lane 3 の GFP-RhoA と内在性 RhoA) は、図 14C と同様であった。

以上の結果をまとめると、cAMP-PKA 系は、unprenylated-form の RhoA を選択的にリン酸化すると考えられた。またこの結論から、今回の研究の発端となった「細胞において RhoA のリン酸化が、過去の報告<sup>34,37)</sup>や私の研究室の過去の実験で検出できなかった理由は何か？」という疑問に、「生理的状態の COS-7 細胞では、RhoA はそのほとんどが翻訳後修飾の prenylation を受けていて、リン酸化されない prenylated-form で存在しているため」と答を出すこともできた。

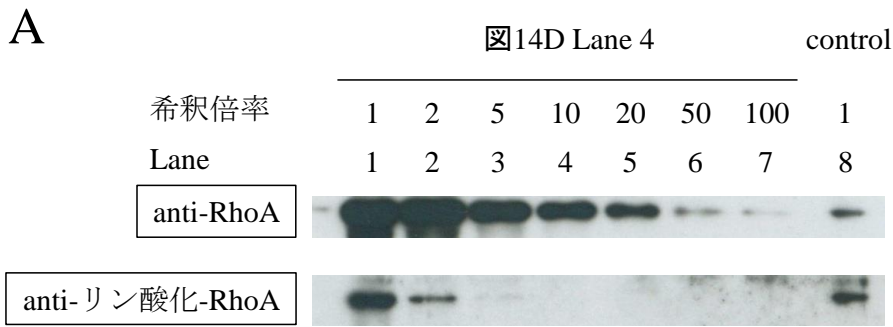
また HEK 293 細胞 (cardiac fibroblast と同じく、RhoA の阻害により cell rounding が生じる) に Pita を投与すると、Fsk の投与がなくても cell rounding の変化が観察された (図 14E)。これは Pita にも RhoA を抑制する作用があることを示唆する。RhoA の活性は、その prenylated-form が細胞膜で GTP-form となることで発揮されるが、Pita の投与で prenylated-form が減少することが証明された (図 14D) ため、この作用により Pita は RhoA を抑制するものと推定された。

### リン酸化される RhoA の定量

unprenylated-RhoA と prenylated-RhoA とでは、前者が選択的にリン酸化されることが、これまでの実験から導かれた。次にこの各々において、cAMP 濃度を上昇させた際のリン酸化された RhoA の割合を求め、選択性を定量的に表すことを試みた。その算出のために、リン酸化の割合が既知の GFP-RhoA WT の試料を作製し、比較対象 (コントロール) として用いることとした。その方法としてリン酸化タンパク質吸着カラムを用いて、リン酸化を受けた GFP-RhoA WT と受けていないものを分離した (「方法」の章の「リン酸化 RhoA の精製」を参照)。このようにしてリン酸化を受けた GFP-RhoA WT を精製し、このコントロールの試料では GFP-RhoA WT は 100%がリン酸化を受けていると見做した。

まず unprenylated-RhoA での検討を、過剰発現させた GFP-RhoA WT で行った。図 14D lane 4 の試料 (unprenylated-form の GFP-RhoA WT に Fsk を投与したもの) を用いて、コントロールと GFP-RhoA の総量、リン酸化された GFP-RhoA の量を比較した (図 15A)。GFP-RhoA の総量については、コントロールのもの (図 15A 上 lane8) が、





|          | Lane 4 | control |
|----------|--------|---------|
| 総RhoA    | 40     | 1       |
| リン酸化RhoA | 2      | 1       |

**B**

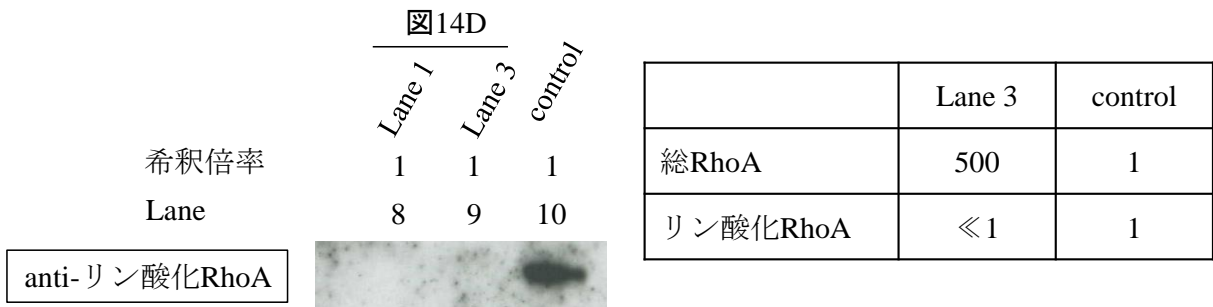
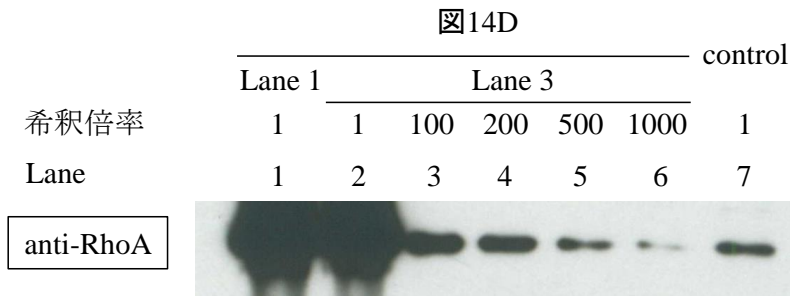


図 15：リン酸化される RhoA の割合の定量

A. 図 14D lane 4 の試料を様々な倍率に希釈して western blotting を行い、GFP-RhoA の総量、リン酸化された GFP-RhoA の量を、それぞれコントロールのものと比較した。

表では、コントロールの GFP-RhoA の総量を 1 とし、それぞれの相対量を示した。コントロールの試料は 100%リン酸化していると思われているので、そのリン酸化された GFP-RhoA の量も 1 となる。

B. 図 14D lane 1 と 3 の試料を用いて、同様に比較を行った。

図 14D lane 4 の試料を 20 倍に希釈したもの (図 15A 上 lane 5) と 50 倍に希釈したものの (図 15A 上 lane 6) の間に相当し、デンストメトリにより 40 倍希釈とほぼ同等と求められた。一方リン酸化された GFP-RhoA の量は、2 倍に希釈したもの (図 15A 下 lane 2) がコントロールのもの (図 15A 下 lane 8) とほぼ同じであった。これより unprenylated-RhoA は、Fsk 刺激下では 5% (= 2/40) がリン酸化されていると算出された (図 15A の表)。

次に prenylated-RhoA での検討を、図 14D の lane 1 と 3 の試料 (prenylated-form の GFP-RhoA WT で、Fsk を投与していないものと投与したもの) を用いて同様に行った (図 15B)。GFP-RhoA の総量は、図 14D の lane 1 と 3 の試料でほぼ同じであり、以後主に lane 3 の試料を使って検討を進めた。図 14D lane 3 の試料を様々な倍率で希釈してコントロールのものと比較すると、500 倍に希釈したもの (図 15B 上 lane 5) が、コントロールのもの (図 15B 上 lane 7) とほぼ同じであった。リン酸化 RhoA については、コントロールのものでは検出された (図 15B 下 lane 10) が、図 14D の lane 1 と 3 の試料ではともに検出されなかった (図 15B 下 lane 8、9)。よってこの方法では、リン酸化される GFP-RhoA の割合が少なくとも 0.2% (= 1/500) 以上であれば検出できることになるが、prenylated-RhoA のリン酸化の割合は、この感度でも検出できないことが判明した (図 15B の表)。

以上より、unprenylated-RhoA が prenylated-RhoA よりも明らかにリン酸化されやすいことを、定量的に証明することができた。

cAMPによるRhoAのリン酸化は、RhoAの活性の状態 (GTP-formまたはGDP-form) に依存しない

RhoAがcAMP-PKA系によってリン酸化されるかを規定するものとして、ここまでの実験で示した prenylationの有無の他に、活性型のGTP-formと不活性型のGDP-formの違いも可能性として挙げ、検討を行った。RhoAを活性化するアゴニストとしてアンジオテンシンII (AII)を用いてGTP-formの割合を増加させ、AIIの投与の有無で過剰発現させたGFP-RhoA WTのリン酸化に変化が生じるかを調べた(図16A)。その結果では、PKAによるGFP-RhoA WTのリン酸化には、AIIの有無による違いは見られなかった(図16A 下 lane 3と4を比較)。ただこの実験では、AIIによりRhoAが十分に活性化したのかや、GTP-formのRhoAが実際にどの程度増加しているのかを確認することができなかった。またRhoAをアゴニストで活性化しても、増加するGTP-formは細胞全体のRhoAの10%以下でしかない<sup>24,34)</sup>ため、リン酸化の差を検出するには少ない可能性も考えられた。

そこで次に、恒常活性型変異のGFP-RhoA G14Vを用いて、そのリン酸化を検討した。GTPase活性が低下するG14Vの変異RhoAは、70%が細胞膜に局在していて、すなわちこれらはGTP-formであると報告されている<sup>36)</sup>。このGFP-RhoA G14VをCOS-7細胞に過剰発現させ、phase separation assayを行った(図16B)。Pitaによりdetergent phaseのprenylated-RhoAが減少しaqueous phaseのunprenylated-RhoAが増加するという変化(図16B 上 lane 1~4と5~8を比較)、unprenylated-formが選択的にリン酸化されるという結果(図16B 下 lane 2、4、6、8)は、GFP-RhoA WT(図14D)と同様だった。さらにG14VとC190Aの2つの変異を同時に持つGFP-RhoA G14V/C190Aを過剰

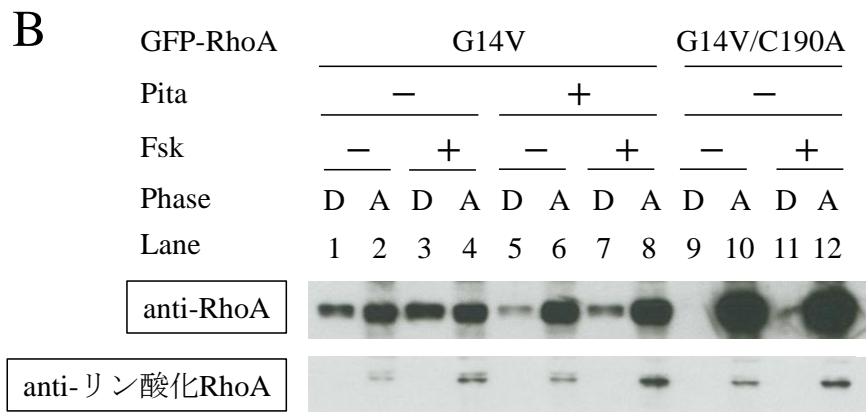
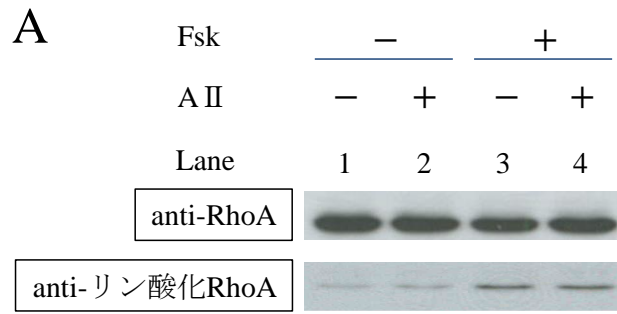


図 16 : RhoA の活性化状態とリン酸化

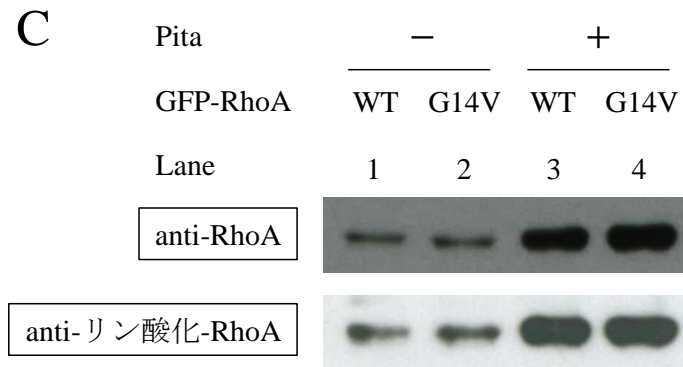


図 16 : RhoA の活性化状態とリン酸化

A. COS-7 細胞に GFP-RhoA WT をアデノウイルスで過剰発現させ、A II (100 nM、1 時間) 及び Fsk (100  $\mu$ M、1 時間) を投与した。そして western blotting により、GFP-RhoA のリン酸化を検討した。

B. COS-7 細胞に GFP-RhoA G14V、または GFP-RhoA G14V/C190A を過剰発現させ、Pita (10  $\mu$ M、24 時間)、Fsk (100  $\mu$ M、1 時間) を投与し、phase separation assay を行った。そして western blotting で、GFP-RhoA の detergent phase と aqueous phase への分離と、リン酸化を調べた。

D : detergent phase

A : aqueous phase

C. Fsk を投与した GFP-RhoA WT と GFP-RhoA G14V の aqueous phase 由来の試料 (図 12D lane 4 と 8、及び図 14B lane 4 と 8 の試料) を用い、lane 1 と 2、lane 3 と 4 でそれぞれ GFP-RhoA の総量が等しくなるように試料の濃度を調整して、western blotting でリン酸化を比較した。

発現させた実験では、GFP-RhoA C190A のもの (図 14C lane 5~8) と同様の結果 (GFP-RhoA は aqueous phase のみに検出され、リン酸化も認められる) が観察された (図 16B lane 9~12)。

そして GFP-RhoA WT と GFP-RhoA G14V それぞれの unprenylated-form におけるリン酸化 RhoA の割合を比較 (図 14D lane 4 と 8、図 16B lane 4 と 8 の試料を使用し、GFP-RhoA の総量がそれぞれ同等になるように試料の濃度を調整した) したところ、Pita の有無に依らず同程度であった (図 16C 下 lane 1 と 2、3 と 4 をそれぞれ比較)。

以上の実験からは、unprenylated-RhoA のリン酸化は、GTP-form と GDP-form の違いでは影響を受けない可能性が考えられた。

#### prenylation の阻害により、RhoA と RhoGDI $\alpha$ の親和性は低下する

cAMP 増加刺激による RhoA のリン酸化が、ゲラニルゲラニル基を持たない unprenylated-form に選択的に生じることから、ゲラニルゲラニル基自体が PKA の作用を阻害している可能性が第一に想像される。しかしゲラニルゲラニル基の存在は、RhoA と RhoGDI の結合に重要な役割を果たしているとされており<sup>22)</sup>、RhoA に結合した RhoGDI によって PKA が阻害されるということも考えられる。その鑑別の試みとして、prenylation の有無が RhoA と RhoGDI $\alpha$  の結合に及ぼす影響を検討した。

まずは GFP-RhoA WT を過剰発現させた COS-7 細胞を用いて、Pita により GFP-RhoA WT の unprenylated-form の割合を増加させると、RhoA と RhoGDI $\alpha$  の複合体の量が変化するかを調べた (図 17A)。その複合体の量は、抗 GFP 抗体を使った共免疫沈降法で GFP-RhoA WT とそれに結合した物質を回収し、その試料で抗 RhoGDI $\alpha$  抗体を 1

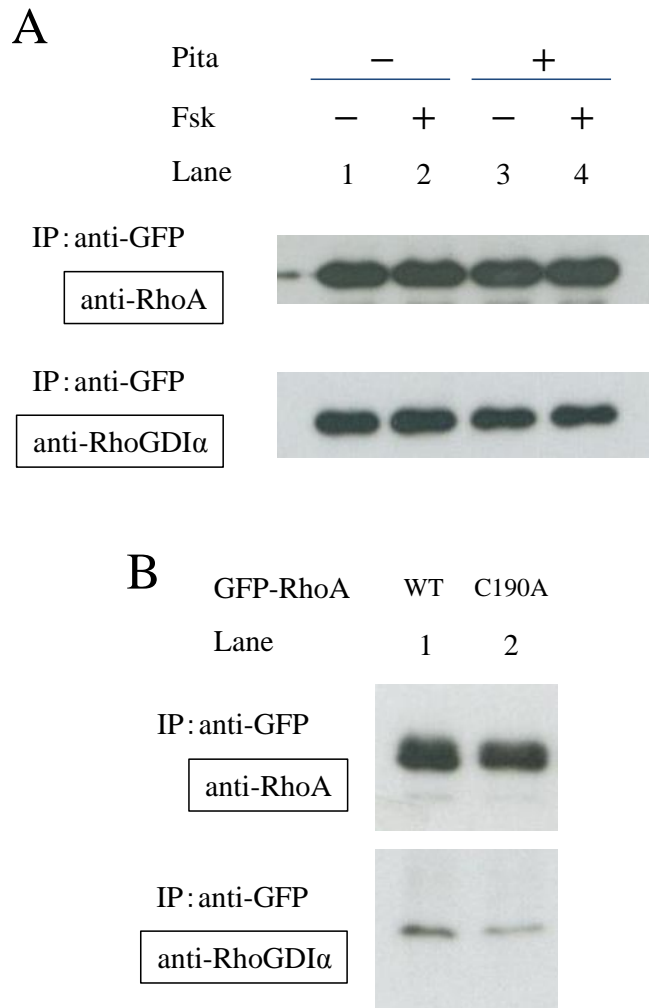


図 17 : RhoA の prenylation の有無と、RhoGDI $\alpha$  との親和性の関係

A. COS-7 細胞に GFP-RhoA WT を過剰発現させ、Pita (10 $\mu$ M、24 時間) を投与した。細胞を破碎して得られた試料に抗 GFP 抗体を用いて共免疫沈降法を行い、抗体と結合したタンパク質を精製回収した。そして SDS-PAGE でそのタンパク質を分離し、抗 RhoGDI $\alpha$  抗体を 1 次抗体に用いて western blotting を行い、GFP-RhoA と結合していた RhoGDI $\alpha$  を検出してその量を比較した。

B. COS-7 細胞に GFP-RhoA WT、または GFP-RhoA C190A を過剰発現させ、A と同様に共免疫沈降法、western blotting を行った。

IP : 免疫沈降 (immunoprecipitation)

次抗体に用いた western blotting を行って、GFP-RhoA WT と結合した RhoGDI $\alpha$  を検出する方法で同定した。免疫沈降で得た GFP-RhoA WT の量に差がないことを、抗 RhoA 抗体を用いた western blotting で確認し (図 17A 上 lane 1、2 と 3、4 を比較)、そして RhoGDI $\alpha$  の比較を行ったところ、GFP-RhoA WT と結合する RhoGDI $\alpha$  は Pita の投与により僅かに減少した (図 17A 下 lane 1、2 と 3、4 を比較)。

次に、prenylation を受けない変異である GFP-RhoA C190A を用いる方法で、同様に GFP-RhoA と結合する RhoGDI $\alpha$  の量を検討した (図 17B)。GFP-RhoA C190A と結合する RhoGDI $\alpha$  は、GFP-RhoA WT と結合するものと比べて減少していた (図 17B 下 lane 1 と 2 を比較)。

以上の 2 つの実験は、unprenylated-RhoA は prenylated-RhoA と比べて RhoGDI $\alpha$  との複合体を形成しにくく、ゲラニルゲラニル基は RhoGDI との結合に関与していると考えられる結果だった。



## 考察

COS-7細胞を用いて cAMP 依存的な RhoA のリン酸化を検討した今回の研究により、cAMP によって活性化される PKA は、prenylation を受けていない unprenylated-form の RhoA を選択的にリン酸化することを発見した。

その端緒となったのは、細胞において cAMP による RhoA のリン酸化が検出されない理由を探究する中で、GFP-RhoA を過剰発現させるとそのリン酸化が検出されたことであった (図 11A)。GFP-RhoA と比べて、内在性の RhoA にはリン酸化を受けにくくなる何らかの性質があると推測して研究を進め、その可能性の 1 つとして prenylation に着目した実験を行ったところ、prenylation を受けない変異 RhoA (GFP-RhoA C190A) では、野生型 (GFP-RhoA WT) よりもリン酸化が増加することが確認された (図 12A)。また prenylation を抑制する可能性が示唆されていたスタチンを投与すると、過剰発現させた GFP-RhoA のリン酸化は同様に増加し、さらに内在性の RhoA のリン酸化も検出されるようになった (図 12B)。この 2 つの結果から、unprenylated-RhoA は prenylated-RhoA よりも PKA の基質になりやすいことが示唆された。さらに細胞のタンパク質を、疎水性のものと親水性のものに分ける phase separation assay で prenylated-RhoA と unprenylated-RhoA を分離する方法を用いて、cAMP により unprenylated-RhoA が選択的にリン酸化されることを証明した (図 14C、14D)。unprenylated-RhoA がリン酸化される割合を求めると、COS-7 細胞においては 5% であり (図 15A)、一方の prenylated-RhoA は 0.2% の検出感度以下 (図 15B) で、その選択性を定量的に示すこともできた。

RhoA のリン酸化に影響を及ぼす別の要素として、unprenylated-RhoA における

GTP-form と GDP-form の違いも検討したが、その実験結果では影響は見られなかった (図 16)。

また prenylation を阻害すると、RhoA と RhoGDI $\alpha$  の親和性が低下するという結果を得た (図 17)。

細胞における cAMP 依存的な RhoA の抑制は、やはりそれ自身のリン酸化によるのではない

cAMP-PKA 系による RhoA の抑制については、「この系により RhoA の 188 位の Ser がリン酸化を受けると、その活性型の GTP-form であっても RhoGDI との親和性が増す。細胞でもこの現象が起こり、RhoA は GTP-form のまま細胞膜から細胞質へ回収され、活性が抑制される。」という Lang らの説明した機序<sup>34)</sup>が少なからず浸透しているようである。しかしそれを細胞で証明した報告<sup>35,36)</sup>は限られており、RhoA のリン酸化が生体においてその作用を本当に修飾しているとの確証は不十分とする意見もあった<sup>44,50,51)</sup>。過去に私の研究室もこの機序では説明できない現象を観察し、細胞において cAMP が RhoA を抑制する機序の本態は、RhoA そのもののリン酸化ではなく RhoGDI $\alpha$  のリン酸化であると報告した<sup>33)</sup>。

今回の実験結果から、「cAMP-PKA 系による RhoA の抑制は、それが直接リン酸化を受けることによる」とするこの説<sup>34)</sup>を改めて考察する。その説では、活性型の GTP-form の RhoA が選択的にリン酸化されるということであった。図 16B lane 3 の試料に含まれる GFP-RhoA G14V は恒常活性型変異であるため、大部分は GTP-form と考えられ<sup>36)</sup>、そして detergent phase の試料であるため同時に prenylated-form である。

つまり detergent phase の GFP-RhoA G14V は、その説で選択的にリン酸化を受けるとされた活性型の GTP-form の RhoA に相当する。しかしこの lane ではリン酸化が検出されていない (図 16B 下 lane 3)。よって少なくとも COS-7 細胞では、cAMP-PKA 系による RhoA の抑制が、そのリン酸化のために生じているとはやはり考えられない。ただし他の細胞にも外挿できるとする根拠はないため、種々の細胞で検討を行うことは必要である。

過剰発現させた GFP-RhoA では、なぜ unprenylated-form が出現するようになるのか？

前項で考察したように、細胞において cAMP-PKA 系により RhoA が抑制される機序は、RhoA 自身のリン酸化によるのではない。しかし RhoA のリン酸化そのものは、細胞においても生じる現象であることも明らかとなった。最初にそれが観察されたのは、過剰発現させた GFP-RhoA WT においてであり、ここから研究を進めて、過剰発現させた GFP-RhoA WT では prenylated-form と unprenylated-form が同程度に存在し、後者が選択的にリン酸化されることを発見した。

ただし内在性の RhoA では検出されない unprenylated-form が、過剰発現させた GFP-RhoA WT では有意な割合で検出される理由は明らかにできていない。その理由を説明する 1 つの仮説として、prenylation の反応が RhoA の翻訳の速さに追い付かないことが考えられる。例えば prenylation を触媒する酵素である GGT- I の数が相対的に不足することにより反応が不十分になるという可能性がある。また RhoGDI $\alpha$  は、GGT- I による prenylation にも関与して、それを促進していることが報告されている<sup>52)</sup>。RhoGDI $\alpha$  の発現量は内在性の RhoA の 3.4~7.4 倍程度である<sup>53)</sup>ため、過剰発現

させた RhoA の発現量がそれ以上となれば、RhoGDI $\alpha$  が相対的に不足してその量に見合った prenylation の反応の速さが得られなくなるのかも知れない。他には、ゲラニルゲラニル基の供給源となるゲラニルゲラニルピロリン酸が prenylation の反応の亢進により枯渇する<sup>54)</sup>、GFP タグが存在すると prenylation の反応が低下する、などの可能性も考えられる。

### PKA の prenylated-RhoA への作用を直接阻害しているのは、ゲラニルゲラニル基そのものか？

unprenylated-RhoA が選択的にリン酸化されるという今回の結果は、過剰発現させた GFP-RhoA が内在性の RhoA よりも PKA によるリン酸化を受けやすい性質を持っていると想定されたことを受けて、その性質が何かを追究するために過去の文献も参考にしながら立てた複数の仮説の 1 つとして、prenylation の有無を挙げたことから導くことができた。その立案に寄与した文献で Ellerbroek らは、リン酸化を受ける 188 位の Ser と prenylation が生じる 190 位の Cys が 2 残基と近接しているために、prenylation が 188 位の Ser のリン酸化に影響する可能性を推測していた<sup>35)</sup>。ただし prenylation の有無で RhoA を分離することを、十分な精度で行うことができなかったためか、結論は述べていない。今回の prenylation の有無とリン酸化の可否が強く関連するという結果からは、ゲラニルゲラニル基が PKA の作用を阻害していると推定することができる。一方で「PKA を阻害するのはゲラニルゲラニル基のみである」と排他的に言うことはできない。例えば、RhoA に結合する RhoGDI が PKA の作用を阻害するという可能性も考えられる。

RhoGDI の主作用の 1 つは、不活性型の GDP-form の RhoA と結合して細胞質で安定化させることである。その結合には RhoA のゲラニルゲラニル基が関わっていて<sup>22)</sup>、prenylation を受けた GDP-form の RhoA は、生理的状态ではほぼ全てが RhoGDI と複合体を形成して細胞質に存在するとされる<sup>35,48,49)</sup>。また RhoA の C 末端に近い 182～187 位に存在するアルギニン (Arg) とリシン (Lys) の塩基性アミノ酸が多い配列 (Arg-Arg-Gly-Lys-Lys-Lys) も、RhoA と RhoGDI の結合に重要な部分とされている<sup>55)</sup>。188 位の Ser は、この 182～187 位のアミノ酸配列とゲラニルゲラニル基が付加される 190 位の Cys に挟まれた位置にあるため、RhoGDI が RhoA に結合していると PKA が 188 位の Ser へ到達できなくなるとも想像され、RhoGDI により RhoA に対する PKA の作用が阻害されると考えることができる。

RhoGDI が PKA の作用を阻害するという仮説や上記の知見に基づけば、細胞質では prenylated-RhoA (ほぼ全てが RhoGDI と結合している) は PKA によるリン酸化を受けない。一方ゲラニルゲラニル基を持たない unprenylated-RhoA においては、182～187 位の塩基性アミノ酸の配列だけでは RhoGDI との結合が弱くなり、複合体を形成せずに遊離しているものが細胞質に生じると想定される (unprenylated-RhoA は親水性なので、RhoGDI と結合しなくても細胞質に存在できる)。遊離している unprenylated-RhoA が十分な量で存在するのであれば、それはリン酸化され実験でも検出可能となる。よって RhoA に結合した RhoGDI に、PKA による RhoA のリン酸化を阻害する作用があるという仮説の下でも、今回の実験の結果は変わらないものと考えられる。

以上の考察を踏まえ私は、RhoA の prenylation の有無で、RhoA と RhoGDI $\alpha$  との親和性が変化するかを、共免疫沈降法を用いて調べることにした (図 17)。その実験結

果は、prenylated-RhoA と RhoGDI $\alpha$  の複合体に比べて、unprenylated-RhoA と RhoGDI $\alpha$  の複合体は減少するというもので、この考察に矛盾しないものであった。同じくその親和性の比較をした論文として、熱力学的モデルを用いて unprenylated-form の親和性が prenylated-form のものより著明に小さいという結果を導いたものがあり<sup>56)</sup>、図 17 の実験結果に近いものだった。よって細胞質の unprenylated-RhoA の少なくとも一部は、RhoGDI と結合せずに存在すると推測される。ただし図 17 の実験結果の解釈に当たっては、この結果が RhoA と RhoGDI $\alpha$  の親和性をそのまま反映しているわけではない可能性に注意しなければならない。例えば図 17A では、RhoA と RhoGDI $\alpha$  の複合体の量の差はごく僅かである。しかし prenylation の有無で親和性に大きな差があっても、過剰発現させた GFP-RhoA の量が RhoGDI $\alpha$  の量に比べて圧倒的に多い状況だと、親和性が低い方でも GFP-RhoA と結合する RhoGDI $\alpha$  が飽和してしまい、複合体の量として検出すると差が見えにくくなってしまうことも考えられる。図 17B の実験での複合体の量の差に比べて、図 17A のものではそれが明らかに小さいのは、過剰発現させた GFP-RhoA と内在性の RhoGDI $\alpha$  の比率が両実験で異なっており、図 17A の実験では実際の親和性の差を過小評価する結果となった可能性がある。同じく過剰発現させた wild-type の RhoA、あるいは prenylation を受けない C190A の変異 RhoA をヒト臍帯静脈内皮細胞に発現させて、共免疫沈降法でそれらの RhoA と RhoGDI の複合体の量を比較し、「RhoA と RhoGDI の結合は、両者で差がなかった」と述べている文献<sup>57)</sup>があるが、これも同じ理由に因るのかも知れない。

前述の通り「RhoGDI に、PKA による RhoA の 188 位の Ser のリン酸化を阻害する作用がある」という仮説は、今回の実験結果には矛盾しないため、それを否定することはできない。ただし一方で「RhoGDI が阻害している」と証明できたわけでもない。

「ゲラニルゲラニル基、結合した RhoGDI、の両者ともが PKA の作用を阻害できる」という可能性もある。prenylation と RhoA のリン酸化の関係を調べるために prenylation を阻害する実験を行ったように (図 12A、B や図 14C、D)、RhoGDI を siRNA などでもノックダウンする実験を行えば、RhoGDI と RhoA のリン酸化の関係をみることもできるとかも知れない。しかし RhoGDI の作用は多岐に渡る (表 1) ので、それをノックダウンすると RhoA の動態、さらには prenylation の反応さえも影響を受ける可能性がある<sup>52)</sup>ので、得られた結果の解釈にはやはり慎重でなければならないだろう。

ところでリン酸化を受けた unprenylated-RhoA が、その後に GGT- I の作用を受け、リン酸化された prenylated-RhoA が生じる可能性はどうであろうか? 無細胞系の実験より、unprenylated-RhoA のリン酸化の有無で GGT- I による prenylation の反応に差はないことが報告されている<sup>35)</sup>。今回の実験ではリン酸化された prenylated-RhoA は全く検出されていないが、Fsk 投与から細胞破碎までの時間をより長くするなど実験条件を変えることにより、リン酸化された unprenylated-RhoA がその後に prenylation を受けて、検出されるようになるかも知れない。しかし Fsk の投与により RhoA のリン酸化が強く検出されるのは投与後 45~90 分であり (図 11C)、この時間の後はリン酸化された RhoA の量は減っていくため、1 時間より長く RhoA を投与してもその可能性は低いと想定している。

#### prenylation 以外の因子が、PKA による RhoA のリン酸化に影響する可能性

RhoA の GTP-form または GDP-form の違いに関しては、unprenylated-RhoA のリン酸化には影響しないという結果が得られた (図 16)。GTP-form が明らかにリン酸化され

やすいと述べている論文<sup>34,36)</sup>、それとは反対で GDP-form がややリン酸化されやすいとする報告<sup>44)</sup>があり、この両者とも一致はしないものであった。各実験には、それぞれ細胞を使った実験か無細胞系かの違いがあり、さらに前者でも細胞の種類は同一ではない。また RhoA を活性化させる方法 (どのアゴニストを用いたか、あるいは恒常活性型変異を利用したか)、cAMP 濃度を上昇させる試薬、RhoA のリン酸化の検出方法など、実験条件が様々であり、中にはそのプロトコルや結果の解釈が不適切である可能性が指摘できるものもあるため、結果も様々になったと思われる。今回の実験も、GTP-form と GDP-form の比率を具体的には確認できていないなどの点で不十分とも言え、結論を確固たるものにするにはさらにデータを補強する実験が必要である。

他に RhoA のリン酸化に影響する可能性があるものとして、エフェクターの結合も検討対象となりうる。古典的な RhoA の活性化/不活性化サイクルのモデルでは、RhoA がエフェクターと結合して活性を示すのは GTP-form で細胞膜に存在する時とされている。しかし細胞質に GTP-form で存在する RhoA の分画があって、それはそこでエフェクターと結合することが可能と報告されている<sup>58,59)</sup>。よってエフェクターの結合の有無と RhoA のリン酸化が関連するかどうかは、RhoA の活性化状態や局在とは独立させて検討しなければならないと考える。

#### unprenylated-RhoA は独自の作用を持つのか？

RhoA を含む低分子量 G タンパク質がその機能を果たす上で、翻訳後の prenylation が重要であることは、広く受け容れられている<sup>22,23)</sup>。unprenylated-RhoA は、その活性化/不活性化サイクル (図 1) に則った挙動ができない。そして unprenylated-RhoA が増



えることで、反対に prenylated-RhoA の生成が減少するのであれば、RhoA の活性は低下すると考えられる。実際スタチンの投与により prenylated-form の RhoA が減少し<sup>60)</sup>、細胞膜に移行する GTP-form の RhoA も減少して<sup>61)</sup>活性が低下することが報告されている。私も RhoA の抑制によって生じる cell rounding が、スタチンの投与でも生じることを観察した (図 14E)。

しかし unprenylated-RhoA が、prenylated-RhoA と同様のシグナルを伝えることができる、あるいは異なった作用を持つ可能性についても論じられている<sup>59,62-67)</sup>。例えば Khan らは、prenylation を触媒する GGT- I をロックアウトしたマクロファージにおいて、RhoA の活性が低下して炎症性サイトカインの産生が減少するという予想に反して、むしろそれが増加することを観察した<sup>62)</sup>。その機序として、unprenylated-RhoA は RhoGDI との親和性が低いために遊離した状態で存在し、GTP-form のものが増加すること、そして unprenylated-RhoA は RhoGAP とも結合できないために GDP-form への不活性化は抑制されることを可能性として挙げている。また Kranenburg らは、N1E-115 cell (マウスの神経芽腫由来の細胞) を用いた実験で、RhoA を活性化させる LPA の投与によるアクチンフィラメントの合成は、スタチンによる prenylation 阻害の有無で変化しなかったが、LPA による細胞形態の変化 (この細胞は fibroblast とは反対に、RhoA の活性化により小さく丸くなる) はスタチンを投与しておくとしなくなると報告した<sup>59)</sup>。その理由として、古典的には RhoA が活性化するには細胞膜への移行が必要とされているが、そうではなくてエフェクターと RhoA が結合しさえすれば、それが細胞質に存在していても活性化されるシグナルがあるという可能性を挙げている。そしてそのような細胞質でエフェクターと結合できる性質を持つ RhoA が、unprenylated-RhoA であると推測している。さらに性質の違いとして、

unprenylated-RhoA は prenylated-RhoA よりもユビキチンなどによる分解を受けにくく、細胞内での寿命がより長いとする報告がある<sup>57)</sup>。このように unprenylated-RhoA 独自の作用の存在が様々に示唆されているが、十分に証明されたものはない。これは今回の研究と関連の深い領域であるので、その解明に私も今後何らかの貢献ができればと思っています。

### unprenylated-RhoA のリン酸化がその作用を修飾するか？

前項で述べたように、unprenylated-RhoA が独自の作用を持つのか否かに関しては、確固とした結論は得られていない。ゆえにその unprenylated-RhoA がリン酸化されることの生物学的意義については全くの未知と断言できない。今回の実験では主に COS-7 細胞を用いたが、この細胞では内在性の RhoA はほぼ全てが prenylated-form で存在していて、unprenylated-form は検出されない (図 14A)。HEK 293 細胞やラットの cardiac fibroblast も同様であった。よってこれらの細胞では、RhoA のリン酸化は生理的な環境では起こらないため、RhoA のリン酸化には生理学的な意義はない、という可能性もあり得る。しかし unprenylated-RhoA が生理的に存在すると報告されている細胞もあり<sup>54)</sup>、prenylation を抑制するような操作を加えずとも内在性の RhoA のリン酸化が検出できたと報告している論文もある<sup>35,36)</sup>。このため、そのような一部の細胞では、cAMP 濃度上昇による RhoA のリン酸化が生理的作用を持っているのではないかと想像できる。unprenylated-RhoA が生理的に存在する細胞は、そのリン酸化が果たす役割を発見するための研究に適したモデル細胞であると思われる。

今回は残念ながらそのような細胞が利用できなかったため、COS-7 細胞に

GFP-RhoA を過剰発現させて、あるいはスタチンを投与して、unprenylated-RhoA が生成される環境を作った。そしてそのリン酸化と、RhoA のエフェクターである Rho-kinase の作用が関連して変化するかどうかを検討した。しかし結論するに足りるデータはまだ得られていない。この実験の難点の 1 つは、cAMP-PKA 系を刺激すると、unprenylated-RhoA だけでなく RhoGDI $\alpha$  もリン酸化されて、prenylated-RhoA が担う RhoA の活性も抑制されてしまうことであると考えている。細胞内で RhoGDI $\alpha$  のリン酸化の影響をいかにして排除するかが、この実験の重要な点と考えており、そのための工夫の模索を続けている。ところで Nusser らは、無細胞系の実験で、RhoA と Rho-kinase の結合は RhoA のリン酸化によって弱まる一方で、別のエフェクターである PKN との親和性は反対に増強したと述べている<sup>45)</sup>。この報告からも、unprenylated-RhoA も作用を持ち、リン酸化がその作用を修飾するという可能性を連想している。

cAMP-PKA 系の刺激で選択的にリン酸化を受ける unprenylated-RhoA だが、それでもリン酸化を受けるのは unprenylated-RhoA 全体の 5% でしかなかった (図 15A)。リン酸化が unprenylated-RhoA の持つ活性を刺激するのであれば、5% のリン酸化でもそれは起こりうる (例を挙げると、RhoA の活性化の際も、細胞膜に移行して GTP-form に変化するのは RhoA 全体の 10% 以下である<sup>24,34)</sup>) ので、その可能性は想像しやすい。一方抑制するのならば、5% の割合でその作用を発揮するとは考えにくい (残り 95% はリン酸化を受けずに活性を維持するため)。しかし強い優性阻害 (dominant negative) 作用を示すのであれば、5% のリン酸化でも抑制作用を発揮すると説明できる。また例えば、細胞全体からすれば僅かな量の RhoA が細胞の特定の部位に局在して特異的な作用を担っており、リン酸化がそのような RhoA に選択的に起こるのであ

れば、やはり細胞全体の unprenylated-RhoA から見ればそのリン酸化の割合は 5%であっても、抑制作用を示し得ると考えられる。今後研究を進めていく上では、刺激、抑制のどちらか片方への先入観は持たず、両方の可能性をそれぞれ検討していく必要がある。

### リン酸化 RhoA の測定が、スタチンの ‘pleiotropic effect’ の予測因子になる可能性

今回の実験では、prenylation を抑制する手段の 1 つとしてスタチンを利用した。スタチンは心血管イベント抑制効果が多数の大規模臨床研究で実証されており、高 LDL コレステロール血症の治療薬として現在第一選択の地位を確立している<sup>68)</sup>。ところでスタチンの臨床効果は、LDL コレステロール低下作用とそれがもたらす心血管イベント抑制にとどまらず、これとは独立した効果の存在、例えば悪性腫瘍の発症抑制や生存期間延長をもたらすなどの可能性<sup>69,70)</sup>が示唆されており、スタチンの「多面的作用 (pleiotropic effect)」と呼ばれている。そしてこの pleiotropic effect をもたらす機序の 1 つとして注目されているのが、RhoA 及びその他の低分子量 G タンパク質の prenylation 抑制である。prenylation 阻害により、例えば RhoA の活性が低下して血管平滑筋が弛緩し (図 3)、本来の LDL コレステロール低下作用に効果を上乘せして心血管イベントの抑制に寄与する、また Ras などの活性が阻害されて悪性腫瘍の進展抑制に働く、などの仮説が唱えられている<sup>3,7,8,69-72)</sup>。

スタチンの投与により unprenylated-RhoA は増加するので、pleiotropic effect の機序の全貌を明らかにするのであれば、unprenylated-RhoA が prenylated-RhoA とは独立した固有の作用を持つのかどうか、cAMP-PKA 系による unprenylated-RhoA のリン酸化

という現象に生物学的な意義があるのかどうか、は、答を出すことを避けては通れない疑問であると思われる。引き続きその解答に注力していきたい。

一方「unprenylated-RhoA のリン酸化が持つ意義が何か」という興味とは独立したこととして、RhoA は unprenylated-form が選択的にリン酸化されるという現象そのものを利用することを考えた。具体的には、リン酸化された RhoA を定量的に評価し、それをスタチンによる prenylation 抑制の指標、pleiotropic effect の予測因子として臨床に応用することである。phase separation assay を用いれば unprenylated-RhoA を直接検出することができるが、リン酸化 RhoA を検出する方法はそれより簡便に行える。今回の実験で私が用いたスタチンの濃度は、臨床用量の内服で得られる血中濃度の約 1000 倍であったが、臨床用量のスタチンの内服でも末梢血単球において prenylation の抑制が検出される（スタチンの内服前は、単球からは unprenylated-RhoA は検出されない）ことが、ヒトの実験で既に報告されている<sup>73,74)</sup>。このように血液中の細胞を用いて測定できるのであれば、被検者の負担も大きくはなく、臨床検査へは発展させやすい(図 18)。

ただしスタチンに本当に pleiotropic effect があるのかどうかについての議論は尽きておらず、先に例に挙げた悪性腫瘍についても、スタチンに有意な進行抑制効果は認められなかった、あるいはスタチンはむしろリスクを高めた、という結果を得た臨床研究も少なからず存在する<sup>69)</sup>。また pleiotropic effect の存在が確立したとしても、それが低分子量 G タンパク質の翻訳後修飾の抑制に依拠するのかどうか、さらにそれも証明されたとしても血球の unprenylated-RhoA の量あるいはその比率の測定で pleiotropic effect を十分に予測できるのか、など、リン酸化された RhoA の測定をスタチンの pleiotropic effect のサロゲートマーカー（現在そのようなものとして確立され

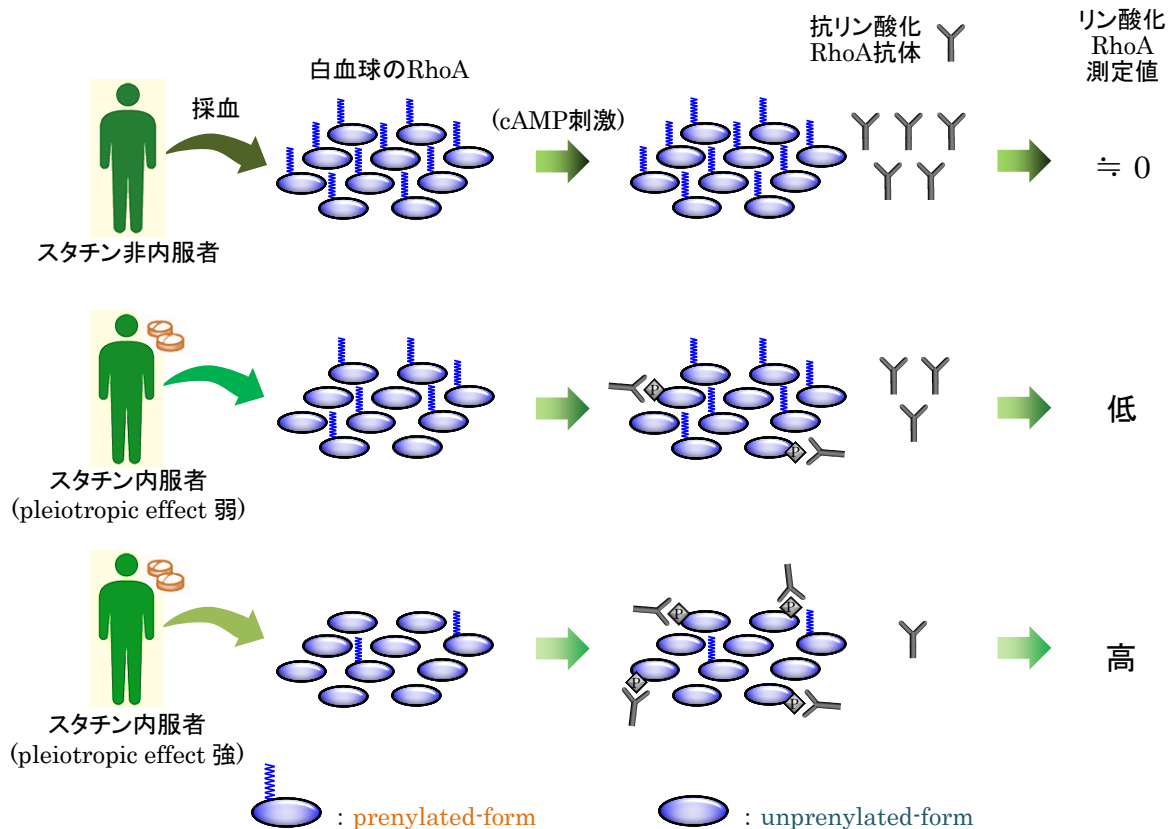


図 18 : RhoA のリン酸化の定量が、スタチンの pleiotropic effect の サロゲートマーカーとなる可能性

cAMP-PKA 系によってリン酸化される unprenylated-RhoA の量は、unprenylated-RhoA の総量と正の相関を示すと考えられる。PKA は unprenylated-RhoA を選択的にリン酸化するので、prenyated-RhoA と unprenylated-RhoA を分離せずにリン酸化された RhoA の量を測定しても、それはやはり unprenylated-RhoA の量と正の相関を持つと想定される。

スタチンを内服していない状態では、白血球の RhoA はほぼ全てが prenylated-form である<sup>73)</sup>。よってリン酸化 RhoA は検出されない。スタチンを内服すると unprenylated-RhoA が生じるのでリン酸化 RhoA が検出されるようになる。そして prenylation 抑制効果が強いほど、その量も多くなる。スタチンを内服しているにも関わらずその値が低い患者は pleiotropic effect が期待しにくいと考えて、他の動脈硬化促進因子の管理をより徹底する、がん検診をより積極的に勧めるなど、患者を層別化してその治療・管理に活かすことができるのでは、と期待している。

リン酸化された RhoA を検出する方法の感度が十分に高く、基底状態でリン酸化されている少量の RhoA でも検出できるのであれば、cAMP-PKA 系の刺激という手順も省略可能となる。

たものはない)として臨床応用するためには、解明されなければならない根本的な前提事項が少なからずある。これらは短期間で答が出るものではないだろうが、私はこのアイデアの発展に期待を持っており、臨床研究を計画して進めている。

### RhoA を交点とするヘテロ三量体 G タンパク質のクロストーク

RhoA を活性化する生理的な刺激については、 $G_{q/11}$  や  $G_{12/13}$  といったヘテロ三量体 G タンパク質を刺激するものやチロシンキナーゼなど様々なものが見つかっている(図 6)。その病態生理への関わりについても、例えばトロンビンは、血管内皮細胞に発現するその受容体に結合して、 $G_q$ 、RhoGEF を介して RhoA を活性化し、透過性亢進や一酸化窒素 (NO) 産生抑制などの作用により血管内皮機能を障害する<sup>54)</sup>、など多くのことが明らかになってきている。

一方 RhoA の抑制については、*Clostridium botulinum* の C3 toxin や *Clostridium difficile* の toxin B が RhoA に特異的に作用して抑制する物質であり、RhoA の機能を解明するための実験にも多く利用されてきたという歴史がある<sup>6)</sup>。しかしこれらは生体外由来の毒素であり、生理的な抑制機構として備わっているわけではない。RhoGAP も Rho サブファミリー G タンパク質の活性を抑えるものであり、RhoA に作用するものだけでも 20 種類以上が同定されている<sup>75)</sup>。その中には RhoA のシグナルの下流で刺激されるもの、あるいは活性型の RhoA に直接結合してエフェクターとしての役割と RhoGAP としての役割を併せ持つものがあり、これらは RhoA を負に調節している独立した機構というよりは、活性化された RhoA に対してネガティブフィードバック作用でその活性を終了させるもの、と考えるのが適切で理解しやすいかも知れない。一

方でヘテロ三量体 G タンパク質の  $\beta\gamma$  サブユニット及びインスリン受容体などのチロシンキナーゼからのシグナルを受ける phosphoinositide 3-kinase (PI3K) によって制御される ARAP3 のように、RhoA を抑制する生理的なシグナルを担うと位置づけられる RhoGAP も存在する<sup>76)</sup>。

ヘテロ三量体 G タンパク質の  $G_s$  を介するもの (cAMP-PKA 系を活性化して RhoGDI $\alpha$  をリン酸化し、それが RhoA を抑制する<sup>33)</sup>) も、独立した RhoA の生理的抑制機構として生体に備わっているものであると考えることができる。しかしその生理学的、病態生理学的な意義は、確立したとまでは言えない。 $G_s$ -cAMP-PKA 系による RhoA の負の制御が病態生理に関わっていることが想定される疾患の 1 つとして、気管支喘息が挙げられる。RhoA は Rho-kinase を介して平滑筋を収縮させる (図 3) ので、気管支喘息の病態への関与が示唆されている<sup>8)</sup>。その治療薬の 1 つとして  $\beta_2$  刺激薬が用いられるが、それが効果を示す機序の少なくとも一部として、 $\beta_2$  受容体の刺激により cAMP が増加して RhoA を抑制し気管支平滑筋を弛緩させる、という経路が関与する可能性が想起される。ただし気管支喘息の病態における RhoA の関与や  $\beta_2$  刺激薬の作用機序には未解明の部分も多く<sup>77)</sup>、この機序も確定的なものではない。

$G_{q/11} \cdot G_{12/13}$  と共役する受容体のアゴニストは RhoA を活性化し、 $G_s$  と共役する受容体のアゴニストはそれとは反対に RhoA を抑制する作用を持つ。このように異なる G タンパク質共役受容体 (GPCR) を介するシグナルが、RhoA においてクロストークを形成してその機能を正負に調節する (図 19) という興味深い制御機構が細胞には備わっている。このクロストークの概念をより明確なものにしていくことを、私の研究室は大きなテーマの 1 つとしている。前述のように、 $G_s$ -cAMP-PKA 系による RhoA の負の制御機構については、未解明である部分が少なくない。それらを明らかにする



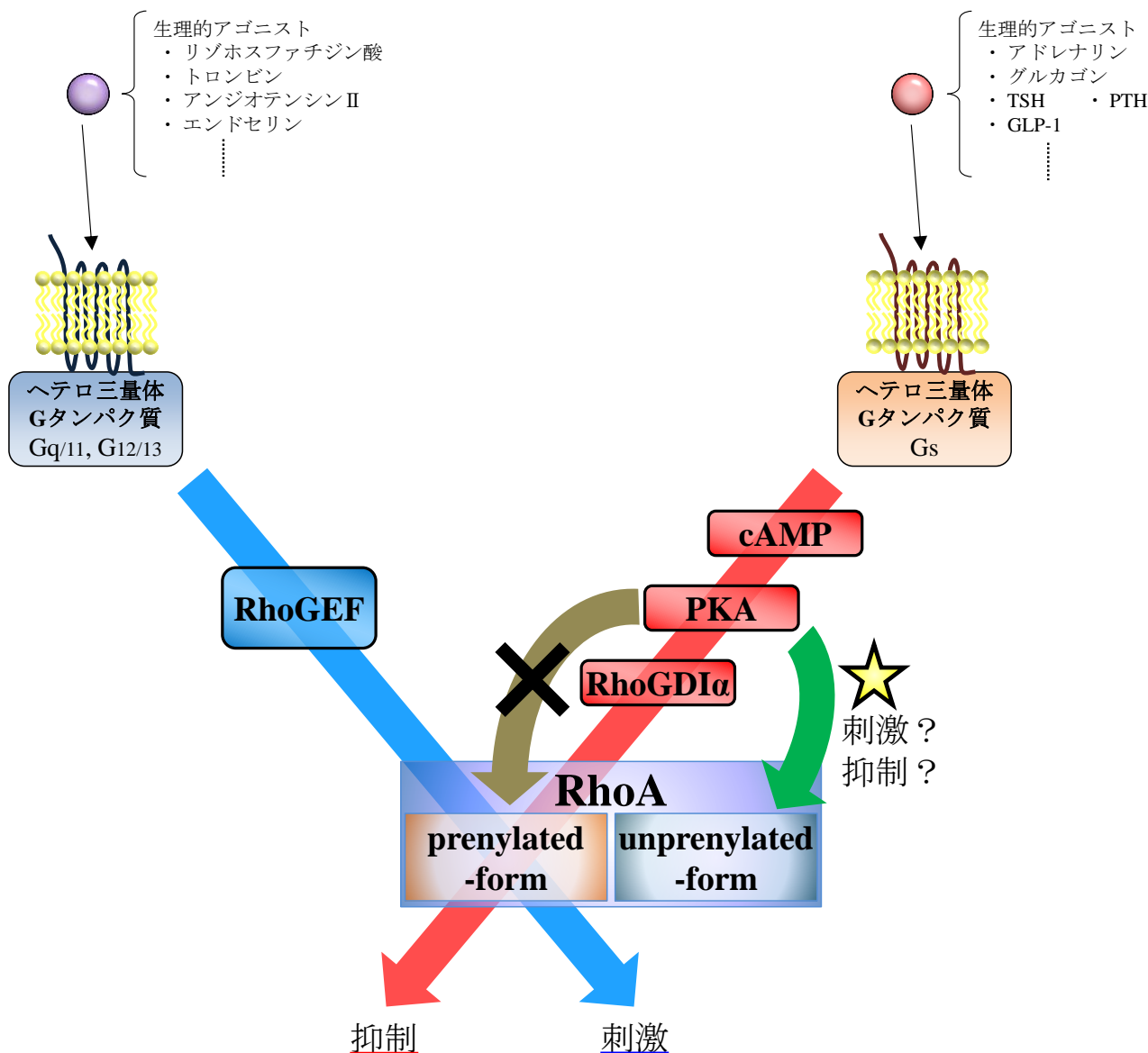


図 19 : RhoA を交点とするヘテロ三量体 G タンパク質のクロストーク

G<sub>q/11</sub>・G<sub>12/13</sub> と共役する受容体を刺激するアゴニストは、RhoGEF を介して RhoA を活性化させる。一方、同じヘテロ三量体 G タンパク質でも G<sub>s</sub> に共役する受容体に結合するアゴニストは、細胞内 cAMP 濃度上昇と PKA を介して RhoGDI $\alpha$  をリン酸化し、活性型の GTP-form の RhoA との親和性を高めて細胞質へ回収することで、RhoA を抑制する作用を持つ。このように異なる種類のヘテロ三量体 G タンパク質により、RhoA を正負に制御するクロストーク機構が存在する。

この制御を受ける RhoA は prenylated-form であるが、その一方で、細胞において PKA が unprenylated-form の RhoA を選択的にリン酸化することを今回の研究で発見した (☆)。この unprenylated-form の選択的なリン酸化が果たしている生物学的な意義を明らかにすることは、残された課題の 1 つである。

ことは、このテーマの中でも大きな比重を占めると考えている。また今回の研究で明らかにした  $G_s$ -cAMP-PKA 系が RhoA の unprenylated-form を選択的にリン酸化するという事象は、このクロストークの概念図に新たな線を描くこととなった (図 19)。その事象が持つ生物学的意義を明らかにできれば、この図をより完成に近づけることになると考えており、引き続き取り組んでいきたい。

## COI

本論文に関連して、開示すべき COI 関係にある企業などはありません。

## 謝辞

本論文は、研究室（内分泌・疾患解析制御研究グループ）を主宰する飯利太朗先生、榎田紀子先生から繰り返しの多大な御高閲を頂いて作成しました。3年の長きにわたり研究や学習の場を与えて頂き、またサイエンティストのあるべき姿勢など物心両面で御配慮・御指導を頂きました。心よりの感謝を第一に申し上げます。

また本論文のテーマは、研究室の先輩である大石篤郎先生が行われた仕事<sup>33)</sup>の延長に当たるものであり、共同研究として取り組ませて頂きました。共同とは言いながら実験技術などの多くは大石先生から教わったもので、こちらが支援できることはなく一方的に援助して頂いたと言ってよい関係でした。私が気を逸らせて自分の能力を超えた量の実験をやろうとすると、「無理はせずに身体のこととも考えなさい」と温かい言葉をかけてくださったことも1度や2度ではありませんでした。この場を借りて、最大限の感謝の気持ちを表します。

研究室の他のメンバー、佐藤潤一郎、間中勝則、矢嶋由紀、橋本真紀子の諸先生方にも、日々の実験のサポート、アイデアの発案など、数多の御助力・御助言を頂きました。この4名の先生方にも厚くお礼を申し上げます。

最後に4年間大学院に在籍させてくださり、様々な御配慮を頂いた腎臓内科学・内分泌病態学教室の指導教員である南學正臣教授に深謝いたします。

以上全ての先生方からの御支援があったがゆえに、このように論文をまとめることができました。その過程で教わった知識、与えてくださった経験を今後役に立ていく所存です。

## 引用文献

- 1) Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420, 629-35 (2002).
- 2) Ridley, A. J. The GTP-binding protein Rho. *Int J Biochem Cell Biol*. 29, 1225-9 (1997).
- 3) Heasman, S. J. & Ridley, A. J. Mammalian Rho GTPases. New insights into their functions from *in vivo* studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9, 690-701 (2008).
- 4) Rojas, A. M., Fuentes, G., Rausell, A. & Valencia, A. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J Cell Biol*. 196, 189-201 (2012).
- 5) Thumkeo, D., Watanabe, S. & Narumiya, S. Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *Eur J Cell Biol*. 92, 303-15 (2013).
- 6) Narumiya, S. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem*. 120, 215-28 (1996).
- 7) Orgaz, J. L., Herraiz, C. & Sanz-Moreno, V. Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases*. 5, e29019 (2014).
- 8) Yeganeh, B., Wiechec, E., Ande, S. R., Sharma, P., Moghadam, A. R., Post, M., Freed, D. H., Hashemi, M., Shojaei, S., Zeki, A. A. & Ghavami, S. Targeting the mevalonate cascade as a new therapeutic approach in heart disease, cancer and pulmonary disease. *Pharmacol Ther*. 143, 87-110 (2014).
- 9) Shimokawa, H. & Satoh, K. 2015 ATVB Plenary Lecture: Translational research on Rho-kinase in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 35, 1756-69 (2015).

- 10) Cholkar, K., Trinh, H. M., Pal D. & Mitra, A. K. Discovery of novel inhibitors for the treatment of glaucoma. *Expert Opin Drug Discov.* 10, 293-313 (2015).
- 11) Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V.  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 83, 1325-58 (2003).
- 12) Amano, M. & Kaibuchi, K. Rho/Rho-kinase in regulation of vascular contraction. *J Jpn Coll Angiol.* 47, 337-41 (2007).
- 13) Kong, X., Yan, D., Sun, J., Wu, X., Mulder, H., Hua, X. & Ma, X. Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin secretion via inhibiting RhoA/ROCK signaling and disassembling glucotoxicity-induced stress fibers. *Endocrinology.* 155, 4676-85 (2014).
- 14) Tao, W., Wu, J., Xie, B.X., Zhao, Y. Y., Shen, N., Jiang, S., Wang, X. X., Xu, N., Jiang, C., Chen, S., Gao, X., Xue, B. & Li, C.J. Lipid-induced muscle insulin resistance is mediated by GGPPS via modulation of the RhoA/Rho-kinase signaling pathway. *J Biol Chem.* 290, 20086-97 (2015).
- 15) Sewer, M. B. & Li, D. Regulation of adrenocortical steroid hormone production by RhoA-diaphanous 1 signaling and the cytoskeleton. *Mol Cell Endocrinol.* 371, 79-86 (2013).
- 16) Zamoner, A., Funchal, C., Jacques-Silva, M. C., Gottfried, C., Barreto-Silva, F. R. & Pessoa-Pureur, R. Thyroid hormones reorganize the cytoskeleton of glial cells through Gfap phosphorylation and Rhoa-dependent mechanisms. *Cell Mol Neurobiol.* 27, 845-65 (2007).

- 17) Itzstein, C., Coxon, F. P. & Rogers, M. J. The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases. *Small GTPases*. 2, 117-30 (2011).
- 18) Luckman, S. P., Hughes, D. E., Coxon, F. P., Graham, R., Russell, G. & Rogers, M. J. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res*. 13, 581-9 (1998).
- 19) van Beek, E.R., Cohen, L. H., Leroy, I. M., Ebetino, F. H., Löwik, C. W. & Papapoulos, S. E. Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates. *Bone*. 33, 805-11 (2003).
- 20) Fueller, F., Bergo, M. O., Young, S. G., Aktories, K. & Schmidt, G. Endoproteolytic processing of RhoA by Rce1 is required for the cleavage of RhoA by *Yersinia enterocolitica* outer protein T. *Infect Immun*. 74, 1712-7 (2006).
- 21) Winter-Vann, A. M. & Casey, P. J. Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat Rev Cancer*. 5, 405-12 (2005).
- 22) Hori, Y., Kikuchi, A., Isomura, M., Katayama, M., Miura, Y., Fujioka, H., Kaibuchi, K. & Takai, Y. Post-translational modifications of the C-terminal region of the rho protein are important for its interaction with membranes and the stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *Oncogene*. 6, 515-22 (1991).
- 23) Boulter, E., Estrach, S., Garcia-Mata, R. & Feral, C. C. Off the beaten paths: alternative and crosstalk regulation of Rho GTPases. *FASEB J*. 26, 469-79 (2012).
- 24) Garcia-Mata, R., Boulter, E. & Burridge, K. The invisible hand: regulation of Rho GTPases by RhoGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12, 493-504 (2011).

- 25) Dovas, A. & Couchman, J. R. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J.* 390, 1-9 (2005).
- 26) Sah, V. P., Seasholtz, T. M., Sagi, S. A. & Brown, J. H. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 40, 459-89 (2000).
- 27) Seasholtz, T. M., Majumdar, M. & Brown, J. H. Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling. *Mol Pharmacol.* 55, 949-56 (1999).
- 28) Sekine, A., Fujiwara, M. & Narumiya, S. Asparagine residue in the Rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyl-transferase. *J Biol Chem.* 264, 8602-5 (1989).
- 29) Sehr, P., Joseph, G., Genth, H., Just, I., Pick, E. & Aktories, K. Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry.* 37, 5296-304 (1998).
- 30) Just, I., Hofmann, F., Genth, H. & Gerhard, R. Bacterial protein toxins inhibiting low-molecular-mass GTP-binding proteins. *Int J Med Microbiol.* 291, 243-50 (2001).
- 31) Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Fichel-Streiber, C., Mann, M. & Aktories, K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature.* 375, 500-3 (1995).
- 32) Voth, D. E. & Ballard, J. D. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev.* 18, 247-63 (2005).
- 33) Oishi, A., Makita, N., Sato, J. & Iiri, T. Regulation of RhoA signaling by the cAMP-dependent phosphorylation of RhoGDI $\alpha$ . *J Biol Chem.* 287, 38705-14 (2012).

- 34) Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M. & Bertoglio, J. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* 15, 510-9 (1996).
- 35) Ellerbroek, S. M., Wennerberg, K. & Burridge, K. Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem.* 278, 19023-31 (2003).
- 36) Murthy, K. S., Zhou, H., Grider, J. R. & Makhlouf, G. M. Inhibition of sustained smooth muscle contraction by PKA and PKG preferentially mediated by phosphorylation of RhoA. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 284, G1006-16 (2003).
- 37) Sauzeau, V., Jeune, H. L., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S. M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P. & Loirand, G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced  $Ca^{2+}$  sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 275, 21722-9 (2000).
- 38) Boltz, S. S., Vogel, L., Sollinger, D., Derwand, R., de Wit, C., Loirand, G. & Pohl, U. Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. *Circulation.* 107, 3081-7 (2003).
- 39) Qiao, J., Holian, O., Lee, B. S., Huang, F., Zhang, J. & Lum, H. Phosphorylation of GTP dissociation inhibitor by PKA negatively regulates RhoA. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295, C1161-8 (2008).
- 40) Iiri, T., Farfel, Z. & Bourne, H.R. Conditional activation defect of a human G $\alpha$  mutant. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 5656-61 (1997).



- 41) Forsayeth, J. R. & Garcia, P. D. Adenovirus-mediated transfection of cultured cells. *Biotechniques*. 17, 357-8 (1994).
- 42) Bordier, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem*. 256, 1604-7 (1981).
- 43) Iiri, T., Backlund, P. S. Jr., Jones, T.L., Wedegaertner, P. B. & Bourne, H. R. Reciprocal regulation of Gs $\alpha$  by palmitate and the  $\beta$ subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93, 14592-7 (1996).
- 44) Dong, J. M., Leung, T., Manser, E. & Lim, L. cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROK $\alpha$ . *J Biol Chem*. 273, 22554-62 (1998).
- 45) Nusser, N., Gosmanova, E., Makarova, N., Fujiwara, Y., Yang, L., Guo, F., Luo, Y., Zheng, Y. & Tigyi, G. Serine phosphorylation differentially affects RhoA binding to effectors: implications to NGF-induced neurite outgrowth. *Cell Signal*. 18, 704-14 (2006).
- 46) Tsujimoto, A., Takemura, G., Mikami, A., Aoyama, T., Ohno, T., Maruyama, R., Nakagawa, M., Minatoguchi, S. & Fujiwara, H. A therapeutic dose of the lipophilic statin pitavastatin enhances oxidant-induced apoptosis in human vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 48, 160-5 (2006).
- 47) Liao, J. K. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest*. 110, 285-8 (2002).

- 48) Stasia, M. J., Jouan, A., Bourmeyster, N., Boquet, P. & Vignais, P.V. ADP-ribosylation of a small size GTP-binding protein in bovine neutrophils by the C3 exoenzyme of *Clostridium botulinum* and effect on the cell motility. *Biochem Biophys Res Commun.* 180, 615-22 (1991).
- 49) Adamson, P., Paterson, H. L. & Hall, A. Intracellular localization of the p21rho proteins. *J Cell Biol.* 119, 617-27 (1992).
- 50) Jaffe, A. B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21, 247-69 (2005).
- 51) Loirand, G., Guilluy, C. & Pacaud, P. Regulation of Rho proteins by phosphorylation in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med.* 16, 199-204 (2006).
- 52) Tnimov, Z., Abankwa, D. & Alexandrov, K. RhoGDI facilitates geranylgeranyltransferase-I-mediated RhoA prenylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 452, 967-73 (2014).
- 53) Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M. & Philips, M.R. Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol.* 152, 111-26 (2001).
- 54) Ohkawara, H., Ishibashi, T., Sakamoto, T., Sugimoto, K., Nagata, K., Yokoyama, K., Sakamoto, N., Kamioka, M., Matsuoka, I., Fukuhara, S., Sugimoto, N., Takuwa, Y. & Maruyama, Y. Thrombin-induced rapid geranylgeranylation of RhoA as an essential process for RhoA activation in endothelial cells. *J Biol Chem.* 280, 10182-8 (2005).

- 55) Hoffman, G. R., Nussar, N. & Cerione, R. A. Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell*. 100, 345-56 (2000).
- 56) Tnimov, Z., Guo, Z., Gambin, Y., Nguyen, U. T., Wu, Y. W., Abankwa, D., Stigter, A., Collins, B. M., Waldmann, H., Goody, R. S. & Alexandrov, K. Quantitative analysis of prenylated RhoA interaction with its chaperone, RhoGDI. *J Biol Chem*. 287, 26549-62 (2012).
- 57) Rolli-Derkinderen, M., Sauzeau, V., Boyer, L., Lemichez, E., Baron, C., Henrion, D., Loirand, G. & Pacaud, P. Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 96, 1152-60 (2005).
- 58) Miyazaki, K., Komatsu, S. & Ikebe, M. Dynamics of RhoA and ROCK $\alpha$  translocation in single living cells. *Cell Biochem Biophys*. 45, 243-54 (2006).
- 59) Kranenburg, O., Poland, M., Gebbink, M., Oomen, L. & Moolenaar, W. H. Dissociation of LPA-induced cytoskeletal contraction from stress fiber formation by differential localization of RhoA. *J Cell Sci*. 110, 2417-27 (1997).
- 60) Rattan, S. 3-hydroxymethyl coenzyme A reductase inhibition attenuates spontaneous smooth muscle tone via RhoA/ROCK pathway regulated by RhoA prenylation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 298, G962-9 (2010).

- 61) Laufs, U., Endres, M., Custodis, F., Gertz, K., Nickenig, G., Liao, J. K. & Böhm, M. Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of Rho GTPase gene transcription. *Circulation*. 102, 3104-10 (2000).
- 62) Khan, O. M., Ibrahim, M. X., Jonsson, I., Karlsson, C., Liu, M., Sjogren, A. M., Olofsson, F. J., Brisslert, M., Andersson, S., Ohlsson, C., Hulten, L. M., Bokarewa, M. & Bergo, M. O. Geranylgeranyltransferase type 1 (GGTase-1) deficiency hyperactivates macrophages and induces erosive arthritis in mice. *J Clin Invest*. 121, 628-39 (2011).
- 63) Allal, C., Favre, G., Couderc, B., Salicio, S., Sixou, S., Hamilton, A. D., Sebti, S. M., Lajoie-Mazenc, I. & Pradines, A. RhoA prenylation is required for promotion of cell growth and transformation and cytoskeleton organization but not for induction of serum response element transcription. *J Biol Chem*. 275, 31001-8 (2000).
- 64) Faure, J. & Dagher, M. C. Interactions between Rho GTPases and Rho GDP dissociation inhibitor (Rho-GDI). *Biochimie*. 83, 409-14 (2001).
- 65) Dunford, J. E., Rogers, M. J., Ebetino, F. H., Phipps, R. J. & Coxon, F. P. Inhibition of protein prenylation by bisphosphonates causes sustained activation of Rac, Cdc42, and Rho GTPases. *J Bone Miner Res*. 21, 684-94 (2006).
- 66) Samuel, F. & Hynds, D. L. Rho GTPase signaling for axon extension: is prenylation important? *Mol Neurobiol*. 42, 133-42 (2010).
- 67) Rogers, M. J., Crockett, J. C., Coxon, F. P. & Mönkkönen, J. Biochemical and molecular mechanism of action of bisphosphonate. *Bone*. 49, 34-41 (2011).

- 68) Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, Mihaylova, B., Emberson, J., Blackwell, L., Keech, A., Simes, J., Barnes, E. H., Voysey, M., Gray, A., Collins, R. & Baigent, C. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet*. 380, 581-90 (2012).
- 69) Pisanti, S., Picardi, P., Ciaglia, E., D'Alessandro, A. & Bifulco, M. Novel prospects of statins as therapeutic agents in cancer. *Pharmacol Res*. 88, 84-98 (2014).
- 70) Zhong, S., Zhang, X., Chen, L., Ma, T., Tang, J. & Zhao, J. Statin use and mortality in cancer patients: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer Treat Rev*. 41, 554-67 (2015).
- 71) Zhou, Q. & Liao, J. K. Pleiotropic effects of statins: basic research and clinical perspectives. *Circ J*. 74, 818-26 (2010).
- 72) Babelova, A., Sedding, D. G. & Brandes, R. P. Anti-atherosclerotic mechanisms of statin therapy. *Curr Opin Pharmacol*. 13, 260-4 (2013).
- 73) Cicha, I., Schneiderhan-Marra, N., Yilmaz, A., Garlichs, C. D. & Goppelt-Struebe, M. Monitoring the cellular effects of HMG-CoA reductase inhibitors in vitro and ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24, 2046-50 (2004).
- 74) Rashid, M., Tawara, S., Fukumoto, Y., Seto, M., Yano, K. & Shimokawa, H. Importance of Rac1 signaling pathway inhibition in the pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Circ J*. 73, 361-70 (2009).
- 75) Tcherkezian, J. & Lamarche-Vane, N. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell*. 99, 67-86 (2007).

- 76) van Buul, J. D., Geerts, D. & Huveneers, S. RhoGAPs and GEFs: controlling switches in endothelial cell adhesion. *Cell Adh Migr.* 8, 108-24 (2015).
- 77) Fogli, S., Stefanelli, F., Battolla, B., Bianchi, F., Breschi, M. C. & Mattii, L. Salbutamol inhibits RhoA activation in normal but not in desensitized bronchial smooth muscle cells. *J Pharm Pharmacol.* 67, 1416-20 (2015).