

Title	リゾホオスファチジン酸受容体とPDZドメインを持つ Rhoグアニンヌクレオチド交換因子 (RhoGEF) との物理的および機能的相互作用の研究
Author(s)	山田, 武史
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47620">https://hdl.handle.net/11094/47620</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	山田 武史
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 21047 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	リゾホオスファチジン酸受容体と PDZ ドメインを持つ Rho グアニンヌクレオチド交換因子 (RhoGEF) との物理的および機能的相互作用の研究
論文審査委員	(主査) 教授 古郷 幹彦 (副査) 教授 豊澤 悟 助教授 西村 理行 講師 久保 和子

### 論文内容の要旨

#### (緒言)

リゾホオスファチジン酸 (LPA) は、細胞の増殖、分化、形態変化の誘導等様々な生理活性を有する血清由来のリン脂質である。LPA は三量体 G タンパク質に共役する細胞膜 7 回貫通型の細胞膜受容体 (GPCR) を受容体としており、現在、LPA 受容体として LPA1、LPA2、LPA3 の三種類の LPA 受容体の存在が知られている。LPA による細胞の形態変化の誘導は LPA 受容体-G タンパク質シグナルが低分子量 G タンパク質の Rho family (Rho、Rac、Cdc42) を活性化して細胞骨格系の変化を起こすことにより引き起こされる。これらの低分子量 G タンパク質の 1 つである、RhoA の LPA 刺激による活性化は、RhoA 特異的な RhoGEF (Rho guanine nucleotide exchange factor) によって制御されていることが明らかになっているが、その機構の詳細はあまり知られていない。本研究では LPA 受容体である LPA1、LPA2 の C 末端が RhoA 特異的な PDZ 領域を有する RhoGEF (PDZ-RhoGEF 及び LARG) の PDZ 領域と選択的に結合することを見出し、この結合が LPA による RhoA の活性化に不可欠であることを明らかにした。

#### (方法と結果)

##### 結合実験

アフィニティ法を用いて、LPA1、LPA2、LPA3 と PDZ-RhoGEF、LARG との結合について検討を行った。HEK293 細胞に LPA1、LPA2、LPA3 を発現させ、そのライセートと PDZ-RhoGEF、LARG の PDZ 領域の MBP 結合ビーズを反応させ、ビーズに結合したたん白をウエスタンブロット法を用いて、解析を行った。

その結果 LPA1、2 ではバンドが検出されたが、LPA3 ではバンドが検出されなかった。このことより LPA1、2 の C 末端が PDZ 領域と結合し、LPA3 とは結合しないことが示唆された。

そこで LPA1、LPA2 と PDZ-RhoGEF、LARG の PDZ 領域との結合には C 末端の配列が重要であると考え、LPA1、LPA2 の C 末端の配列を AAA に置換したものを構築した。

再度これらを用いてアフィニティ法を行い LPA1、LPA2 の C 末端を AAA に置換したものと PDZ-RhoGEF、LARG との結合について検討した。その結果 LPA1、2 の C 末端を AAA に置換したものでは、バンドは検出されなかった。

このことより、LPA1、LPA2 の C 末端を AAA に置換したものと PDZ-RhoGEF、LARG の PDZ 領域との結合に

は C 末端の配列が重要であることが考えられた。

#### 免疫沈降法

細胞内での結合を調べるために、HEK293 細胞に Myc-LARG、Flag-LPA1、LPA1-AAA を発現させ免疫沈降法を用いて、LPA1、LPA2 と LARG、LARG  $\Delta$  PDZ との結合について検討した。

その結果 myc-LARG を myc 抗体で沈降させたものは LPA1 と共に沈降したが、C 末端を変えた LPAAAA、LARG  $\Delta$  PDZ では沈降しなかった。また逆に flag 抗体で flag-LPA1、LPAAAA を沈降した場合 LPA1 では LARG が沈降したが、LPA1AAA、LARG  $\Delta$  PDZ では沈降しなかった。これらの結果より LARG 及び LPA1 は vivo で結合し、LARG の PDZ 領域が LPA1 との結合に重要であることが明らかになった。

#### MAPK 活性、Rho 活性の解析

LPA1、LPA2、LPA3 と LPA1 と LPA2 の C 末端を AAA に変換したものを HEK293 細胞に発現させ、LPA 刺激による MAPK と Rho の活性化の解析を行った。

その結果、PDZ 領域との結合が示唆された LPA1、2 では Rho の活性がみられたが、PDZ 領域との結合が示唆されなかった LPA3、LPA1AAA、LPA2AAA では Rho の活性がみられなかった。しかし、MAPK 活性については LPA1、LPA2、LPA3、LPA1AAA、LPA2AAA すべてにおいて MAPK 活性がみられた。

このことより、LPA1、LPA2 と PDZ-RhoGEF、LARG の PDZ 領域の結合が Rho-GEF 活性に直接関与しており、MAPK 活性には PDZ-RhoGEF、LARG との結合は関与しないということが示唆された。

次に LPA 刺激による RhoA の活性化に実際に KIAA-0380 や LARG が関与しているかどうか検討する為、HEK293 細胞に LPA1、2 とおよび PDZ-RhoGEF、LARG の PDZ 領域を共発現させ、同様に Rho 活性と MAPK 活性について検討を行った。

その結果、共発現させたものでは、Rho 活性が完全に抑制されたが MAPK 活性に対しては影響は無かった。

このことは発現させた PDZ 領域により LPA 受容体と内在性の PDZ-RhoGEF や LARG の結合を阻害した結果だと考えられ、LPA による RhoA の活性化に実際に内在性の PDZ-RhoGEF や LARG が関与している事が示された。

LPA 受容体と PDZ-RhoGEF や LARG の結合による RhoA の活性化に G タンパク質が関与しているかどうか検討する為 PDZ-RhoGEF や LARG の RGS 領域を HEK293 細胞に LPA 受容体とともにトランスフェクトし、LPA 刺激による Rho、MAPK 活性化について検討を行った。

その結果、MAPK 活性においては差は認められなかったが、Rho 活性においては、共発現させたものにおいて、活性が顕著に抑制された。

これは LPA 刺激による Rho の活性化には PDZ-RhoGEF や LARG との結合とともに G タンパク質おそらく G12、13 の関与が必要であることを示唆しているものということが考えられた。

(まとめ)

- ①LPA1、LPA2 の C 末端と PDZ-RhoGEF、LARG の PDZ 領域は結合するが、LPA3 とは結合しないことが明らかになった。
- ②これらの C 末端での LPA 受容体と PDZ-RhoGEF、LARG との結合は Rho の活性化には必要であるが、MAPK の活性化には必要ではなかった。
- ③PDZ-RhoGEF、LARG は plexinB1、IGF-1 とも機能的な結合が報告されている事から、これらのシグナルと LPA のシグナルが PDZ-RhoGEF、LARG とクロストークする可能性が考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、細胞内シグナル伝達の過程において、LPA 受容体/PDZ ドメインを持つ RhoGEF 複合体の形成が、LPA により誘導される RhoA 活性化において極めて重要な役割を果たす可能性を示唆しているものである。

この論文は、PDZ ドメインを持つ RhoGEF によって、LPA 受容体 (LPA<sub>1</sub> と LPA<sub>2</sub>) と RhoA 活性化の間の関連性もたらされることが示唆されたという点で、非常に有意義であり、博士 (歯学) の学位に値するものと認める。