

α 1-アンチトリプシンC末端ペプチドによる
受容体非依存的G α 13制御機構の解析

朴 龍鶴

目次

要旨	2
第一章 序論	3
第二章 材料及び方法	8
第三章 結果	14
第四章 考察	33
参考文献	36
謝 辞	44

要旨

$\alpha 1$ -アンチトリプシン (AAT) は、血中に豊富に含まれるセリンプロテアーゼ阻害剤であり、炎症時に好中球等から分泌される過剰なエラスターゼを抑制する抗炎症タンパク質である。AATはエラスターゼやマトリックスメタロプロテアーゼ等により切断され、その産物として数十アミノ酸からなるC末端ペプチドが産生される。AAT-C末端ペプチドは様々な組織に存在し、複数の機能を持つ生理活性ペプチドとして提唱されている。先行研究において、マウスAATの35アミノ酸からなるC末端ペプチド (mAAT-C₁₋₃₅) が細胞膜を貫通し、ヘテロ三量体Gタンパク質G α サブユニットの一つであるG $\alpha 13$ と会合することが報告された。しかし、mAAT-C₁₋₃₅によるG $\alpha 13$ の制御機構は不明である。本論文では、mAAT-C₁₋₃₅がN末端領域 (mAAT-C₁₋₁₇) を介してグアノシン二リン酸 (GDP) 結合型G $\alpha 13$ に直接結合し、GTP非存在下で活性型構造を誘導することにより、G $\alpha 13 \cdot \text{GDP}$ とそのエフェクタータンパク質との相互作用を促進することを明らかにした。また、この作用に必要な最小配列 (mAAT-C₃₋₁₆) と必須アミノ酸残基 (Phe11) を同定した。G $\alpha 13 \cdot \text{GDP}$ -mAAT-C₁₋₁₇複合体の分子動力学シミュレーションから、G $\alpha 13$ のスイッチ領域に囲まれた領域にmAAT-C₁₋₁₇が結合することで、スイッチIIおよびIII領域が安定化し、活性型コンフォメーションが維持されることが分かった。さらに、mAAT-C₁₋₃₅は細胞内G $\alpha 13$ シグナル伝達経路の活性化を誘導すること、この誘導にはPhe11が必須であることを示した。本研究は、G $\alpha 13$ の制御におけるAAT-C末端ペプチドの構造に基づいた作用機序を明らかにし、AAT-C末端ペプチドがGタンパク質共役型受容体非依存的にGタンパク質シグナルを活性化できる生物学的ペプチドであることを示した。

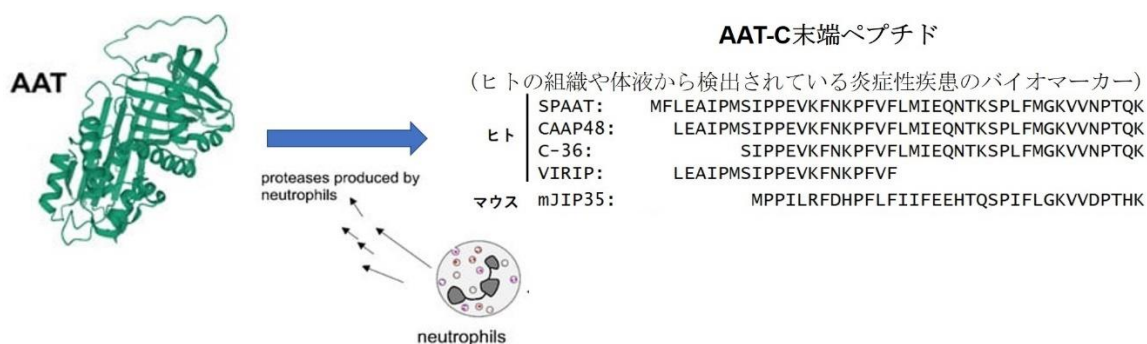
第一章

序論

[α 1-アンチトリプシン (AAT) とAAT-C末端ペプチド]

セリンプロテアーゼインヒビターファミリーA (SERPINA) に属する α 1-アンチトリプシン (AAT) は、主に肝細胞で産生される急性期タンパク質であり、炎症時に血中濃度が上昇する(1, 2)。AATは、エラスチン、コラーゲン、プロテオグリカンなどの細胞外マトリックスタンパク質を分解するヒト好中球エラスターゼ (HNE) の阻害因子としてよく知られており (3, 4)、炎症時にエラスターゼによる組織破壊が起こるのを防ぐ抗炎症タンパク質として機能する。AATの血中濃度が低下するアンチトリプシン欠乏症は、AATをコードするSERPINA1遺伝子の変異または欠失を伴う遺伝性疾患であり、肺と肝臓に慢性的な組織破壊が起こり、COPD(慢性閉塞性肺疾患)を高頻度に発症する (5, 6)。

HNEはAATに直接結合し、反応中心ループのMet382-Ser383の部位でAATを切断する。その結果、複合体のコンフォメーションが変化し、HNEは不可逆的に不活性化する(7)。この阻害反応においては36アミノ酸からなるAAT-C末端ペプチドが産生されるが、HNE以外にも、マトリックスメタロプロテアーゼを含む様々なプロテアーゼが、反応中心ループとは異なる部位でAATのカルボキシル末端を切断し、長さの異なる複数のAAT-C末端ペプチドが産生されることが知られている(8)。これらのペプチドはヒトの組織や体液から検出されており、炎症性疾患のバイオマーカーとして提唱されている(9-14)。一方、最近の研究では、AAT-C末端ペプチドが有する生理機能が報告されており、例えば、ナチュラルキラー細胞の抑制(15)、細胞外マトリックスの保護(16)、HIVの侵入阻害(17)などがあげられる。所属研究室の先行研究においては、マウスAAT1-2タンパク質 (Serpin A1b) の35-アミノ酸からなるC末端ペプチドが、細胞膜を貫通し、ヘテロ三量体Gタンパク質G α サブユニットの一つであるG α 13を介してタイトジャンクションを強化する作用を持つことが示された (18)。しかし、AAT-C末端ペプチドがG α 13を制御するメカニズムは未解明であった。(Fig. 1)



Randall F. et.al, α 1-Antitrypsin A treatment attenuates neutrophil elastase accumulation and enhances insulin sensitivity in adipose tissue of mice fed a high-fat diet.. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. (2021)より改変

Fig. 1 Alpha-antitrypsin (AAT) C末端ペプチド

[ヘテロ三量体Gタンパク質とGタンパク質共役型受容体]

ヘテロ三量体Gタンパク質は、G α 、G β 、G γ からなる3つのサブユニットによって構成され、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）に結合して、GPCRの活性化シグナルを細胞内に伝達する細胞内シグナル伝達因子として機能する。G α サブユニットには、Gas、Gai/o、Gaq/11、G α 12/13のサブファミリーがあり、それぞれ結合するGPCRと標的タンパク質が異なる（Table. 1）。G α 13はG α 12/13サブファミリーに属し、スフィンゴシン-1-リン酸レセプター2（S1PR2）（19）、トロンビンプロテアーゼ活性化レセプター-1（PAR1）（20）、リゾホスファチジン酸レセプター4（LPA4）（21）など、20以上のGタンパク質共役型受容体（GPCR）と共役することが報告されている。（Table. 2）。

Gタンパク質	機能・作用	Second Messenger	Second Effector
Gas	アデニル酸シクラーゼ活性化	cAMP 増加	プロテインキナーゼA (PKA) 活性化
Gai/o	アデニル酸シクラーゼ抑制	cAMP 抑制	プロテインキナーゼA (PKA) 抑制
Gaq/11	ホスホリパーゼC β (PLC β) 活性化	イノシトール1,4,5-三リン酸 (IP3)、ジアシルグリセロール (DAG) 増加	IP3 受容体刺激、プロテインキナーゼC (PKC) 活性化
G α 12/13	RhoGEFs (p115-RhoGEF, LARG) 活性化	RhoA	Rho-kinase (ROCK) 活性化

Table. 1 G α サブユニットの機能及び作用

受容体	Gタンパク質	機能・作用
Sphingosine 1-phosphate		
S1P2/S1P3	G α 12/13	Stress fiber formation
S1P3	G α 12/13	Inflammation
S1P2	G α 12/13	Myofibroblast contraction
S1P3	G α 13	Cardioprotection
Thrombin		
PAR1	G α 13	Cell transformation
PAR1	G α 12/13	Endothelial cell permeability
Thrombin receptor	G α 12/13	NO production in macrophage
Thrombin and thromboxane A2	G α 12/13	Platelet activation
Lysophosphatidic acid		
LPA4	G α 12/13	Limits proper adipose tissue expansion and remodeling in diet-induced obesity
LPA4	G α 12/13	Hypertensive response
LPA4/LPA6	G α 12/13	Angiogenesis
LPA receptor	G α 13	Stress fiber formation
Angiotensin		
AT1R	G α 12/13	Hyperplasia of cardiac fibroblasts
AT1R	G α 12/13	Vascular endothelial dysfunction
Bradykinin		
B2	G α 13	Stress fiber formation
Serotonin		
5-HT2C	G α 13	Stress fiber formation

Yang et.al, G α 12/13 signaling in metabolic diseases. Exp Mol Med. (2020)から一部引用

Table. 2 G α 12/13が共役するGPCRと生理機能

古典的なGPCRを介したGタンパク質シグナル伝達経路（Fig. 2）では、リガンド非存在下において、GPCRはGDPに結合した不活性型 $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ との複合体と結合しており、 $G\beta\gamma$ はGPCRと $G\alpha \cdot GDP$ を細胞膜上で結合させるとともに、グアニンヌクレオチド解離阻害剤（GDI）として $G\alpha$ からのGDPの解離を抑制している。リガンドが結合すると、GPCRはグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）として機能し、 $G\alpha \cdot GDP$ から $G\alpha \cdot GTP$ への変換を促進する。GTPの結合は、 $G\alpha$ 上の3つのスイッチ領域のコンフォメーション変化を引き起こし、その結果、 $G\alpha\beta\gamma$ 複合体は $G\alpha \cdot GTP$ と $G\beta\gamma$ サブユニットに解離する。その後、 $G\alpha \cdot GTP$ と $G\beta\gamma$ がそれぞれの下流のシグナルを制御する(22-24)。 $G\alpha_{13} \cdot GTP$ の標的因子としてはp115-RhoGEFや白血病関連RhoGEF（LARG）などのRhoグアニンヌクレオチド交換因子（RhoGEF）が挙げられ、その下流であるRhoA-Rock(RhoA キナーゼ)シグナルを活性化し、アクチン細胞骨格を再編成することにより細胞移動や細胞形態を制御することが知られている(25-29)。

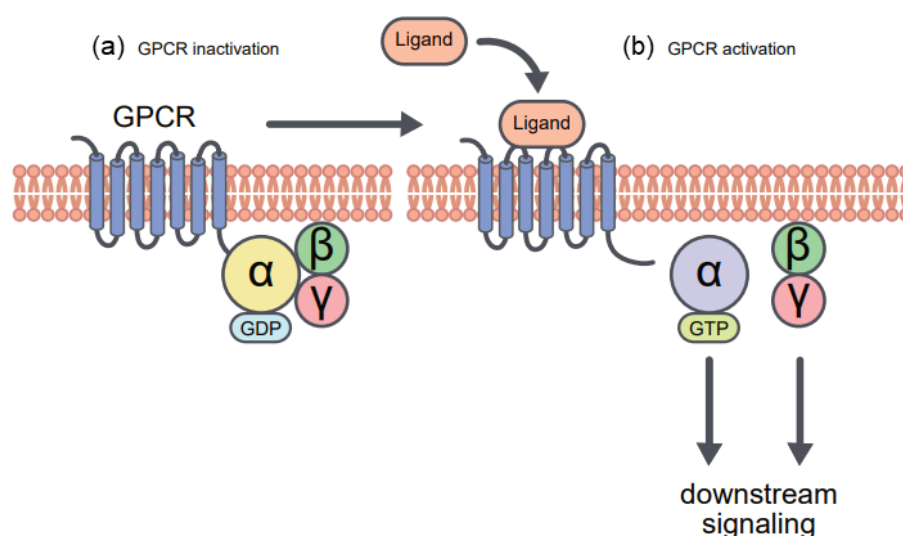


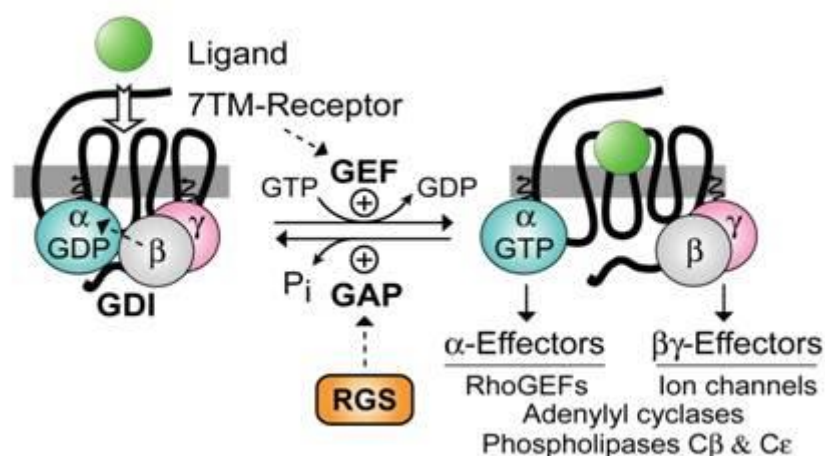
Fig. 2 古典的GPCR-三量体Gタンパク質のシグナル伝達機構

- (a) リガンド非存在下では、不活性型の $G\alpha \cdot GDP$ が $G\beta\gamma$ と会合し、GPCRと結合している。
- (b) リガンドと結合したGPCRはGEFとして機能し、 $G\alpha \cdot GDP$ から $G\alpha \cdot GTP$ への変換を促進する。 $G\alpha \cdot GTP$ は $G\beta\gamma$ と解離し、それぞれの下流シグナルを活性化する。

[GTPaseサイクル]

$G\alpha$ サブユニットはGTPase活性を有し、自己触媒によってGTP結合型からGDP結合型に変換する。これにより、 $G\alpha$ は活性状態のGTP結合型と不活性なGDP結合型の間を循環する分子スイッチとして働き、細胞シグナル伝達のON/OFFを可能としている。このような $G\alpha$ のGTP結合型とGDP結合型のサイクルをGTPaseサイクルと呼ぶが、この往復するプロセスは、それぞ

れGEFとGTPase活性化因子（GAP）によって補強される。GEFはG α -GDPをG α -GTPへ変換してシグナルをONにし、GAPはG α のGTPase活性を促進することによりG α -GTPをG α -GDPへ変換してシグナルをOFFにする（30-36）。G α 13の場合は、その標的タンパク質であるp115-RhoGEFやLARGのRGSホモロジー(RH)ドメインがG α 13のGAPとして働き、G α 13とp115-RhoGEF/LARG間の可逆的なシグナル制御を可能にしている(37-39)。（Fig. 3）



David P. et al, The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits, Int. J. Biol. Sci. (2005)

Fig. 3 GTPaseサイクルの仕組み

[GPCR非依存的なヘテロ三量体Gタンパク質の活性制御]

GPCR依存的なヘテロ三量体Gタンパク質の活性機構は広く知られているが、近年、GPCRに依存しないGタンパク質活性化機構の存在が明らかになりつつある（40）。例えば、Girdin/G α -interacting Vesicle-associated(GIV)は、Giに対しては非受容体型細胞質GEFとして（41）、Gsに対してはGDIとして働く（42）ことが報告された。また、G α に対して類似の作用を有する一連の非受容体型グアニンヌクレオチド交換モジュレーター(GEMs)も同定されている。しかし、GPCR非依存的なG α 13の活性化については、これまで報告がなされていない。本研究では、AAT-C末端ペプチドがGPCR非依存的にG α 13シグナルを活性化することを明らかにした。

第二章

材料及び方法

【ペプチド】

合成ペプチドはPEPTIDE INSTITUTE INCまたはSCRUM INCで製造した。各ペプチドは1%酢酸 (mAAAT-C₁₋₃₅、mAAAT-C₁₈₋₃₅、 mAAAT-C₁₋₁₇)、5%酢酸 (mAAAT-C₁₋₁₀、mAAAT-C₁₋₁₁、 mAAAT-C₁₋₁₂、mAAAT-C₁₋₁₃、mAAAT-C₁₋₁₄、mAAAT-C₁₋₁₅、mAAAT-C₁₋₁₆、mAAAT-C₁₋₁₇、mAAAT-C₃₋₁₆、mAAAT-C₄₋₁₆、mAAAT-C₅₋₁₆、mAAAT-C₁₋₁₇M1A、mAAAT-C₁₋₁₇P2A、mAAAT-C₁₋₁₇I4A、mAAAT-C₁₋₁₇L5A、mAAAT-C₁₋₁₇F7A、mAAAT-C₁₋₁₇D8A、mAAAT-C₁₋₁₇F11A、mAAAT-C₁₋₁₇L12A、mAAAT-C₁₋₁₇F13A、mAAAT-C₁₋₁₇L14A、mAAAT-C₁₋₁₇I15A、mAAAT-C₁₋₁₇F16A、mAAAT-C₁₋₁₇E17A)、DMSO (mAAAT-C₆₋₁₇、mAAAT-C₅₋₁₇、mAAAT-C₄₋₁₇、mAAAT-C₃₋₁₇、mAAAT-C₂₋₁₇、mAAAT-C₁₋₁₇、mAAAT-C₁₋₁₇P3A、mAAAT-C₁₋₁₇P10A)、1%アンモニア溶液 (mAAAT-C₁₋₁₇R6A、mAAAT-C₁₋₁₇H9A)、または蒸留水 (miniPEG-mAAAT-C₁₋₃₅、miniPEG-mAAAT-C₁₋₃₅F11A、miniPEG-mAAAT-C₃₋₁₆、miniPEG-mAAAT-C₃₋₁₆F11A) で溶解した。

【組換えタンパク質】

GST-Gai/13キメラをコードするプラスミドは、ラットGai1のN末端(アミノ酸残基1-28)コード領域をGal13(アミノ酸残基47-377)コード領域にライゲーションし(43)、その産物をpGEX-6P-1にサブクローニングすることにより調製した。GST-p115-RHまたはGST-LARG-RHの発現コンストラクトは、ヒトp115RhoGEF(アミノ酸残基1-252)またはヒトLARG(アミノ酸残基319-598)のコード領域をpGEX-6P-1にサブクローニングすることにより作製した。QIAGEN Plasmid Mini Kit(QIAGEN, 12123)を用いてプラスミドDNAを単離し、BL21[DE3]に導入した。500mLのLB培地(1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、100μg/mLアンピシリン)に、pGEX-6P-1-Gai/13、pGEX-6P-1-p115-RH、pGEX-6P-1-p115-RH(42-252)、またはpGEX-6P-1-LARG-RHのコロニーを培養した。培養は37℃で3-4時間、振盪しながら行い、その後1mMのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を加え、18℃で18時間培養した。細胞ペレットを20 mLのTrisバッファー(50 mM Tris, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pH 8.5)に懸濁し、超音波処理した後、15,000 rpmで20分間遠心した。上清にグルタチオンセファロース4Bビーズ(Cytvia, 17075601)を加え、4℃でO/Nインキュベートした。Trisバッファーでビーズを洗浄後、GST-Gai/13、GST-p115-RH、GST-LARG-RHの組換えタンパク質を、溶出バッファー(50mM Tris、10mM グルタチオン、2mM DTT、1mM PMSF、2ug/ml アプロチニン、pH9.5)でビーズから溶出した。次いでHEPESバッファー(20mM HEPES、10mM 2-メルカプトエタノール(β ME)、1mM MgCl₂、100mM NaCl、10μM GDP、pH8.0)で透析した。透析後、GDPを最終濃度10μMでGST-Gai/13に添加した。GSTタグを切断するために、GST-Gai/13タンパク質をグルタチオンセファロース4Bビーズカラムに結合させ、Trisバッファーで洗浄し、PreScission Proteaseバッファー(50 mM Tris,

100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8.0) 中でPreScission™ Protease (Cytvia, 27084301) と共に4℃でO/Nインキュベートした。GSTタグなしGαi13は、セルロース透析チューブメンブレン (Viskase Companies Inc.) 透析後、GDPを最終濃度10μMで添加した。

【プロテインフットプリンティング】

本実験は、共同研究者である小形公亮助教・石濱泰教授（京都大学大学院薬学研究科）が実施した。リコンビナントヒトGNA13タンパク質（Tagged, 1 μg）（Abcam, ab268597）を、200 ngのmAAT-C₁₋₃₅ペプチド（200 ng）存在下または非存在下で220 μLの緩衝液（40 mM Tris-HCl pH 7.5, 80 mM NaCl, 8 mM MgCl₂, 10 mM 4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoic acid and 10 mM NaOH）に溶解した。この溶液50μLを液体窒素に入れ、UV-LED照射器（ULED-102CT、祥伝社）を用いて365nmの紫外線を1秒間照射し、タンパク質を標識した。照射後、タンパク質を10mMジチオスレイトールで還元し、50mMヨードアセトアミドでアルキル化し、トリプシンで消化した。消化物はStageTipsで脱塩し、真空遠心機で乾燥した。

【LC/MS/MS分析】

本実験は、共同研究者である小形公亮助教・石濱泰教授（京都大学大学院薬学研究科）が実施した。アフィニティー精製実験から得られた乾燥ペプチドを、4%アセトニトリル、0.015% n-ドデシル-β-D-マルトシド(44)、および0.5%トリフルオロ酢酸を含む溶液50μLに再構成した。その後、Ultimate 3000 RSLCnano LCポンプ（Thermo Fisher Scientific）とPAL-xt HTCオートサンプラー（CTC Analytics）を組み合わせたQ Exactive質量分析計を用いて、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析（LC/MS/MS）で分析した。0.5%酢酸からなる移動相Aと、0.5%酢酸を含む80%アセトニトリルからなる移動相Bを使用した(45)。ペプチドは、Reposil-Pur 120 C18-AQ 3 μm (Dr. Maisch)を充填した逆相C18カラム(100 μm × 15 cm)で、500 nL/分の流速で5%から99% Bまでの40分間の直線グラジエントを用いて分離した。質量分析計はデータ依存捕捉 (DDA)モードで動作し、高エネルギー衝突解離(HCD)によるフラグメンテーションのために、27の正規化衝突エネルギーで最も強度の高い上位10個のプリカーサーイオンを選択した。生のMSデータは、Skyline-daily (バージョン23.1.1.459) (46)を用いて、プレカーサーイオンのピーク面積に基づいてペプチド定量用に処理された。フットプリンティング実験から得られた乾燥ペプチドを、4%アセトニトリルと0.5%トリフルオロ酢酸を含む溶液7μLに再構成した。これらのペプチドは、Orbitrap Fusion Lumos質量分析計とUltimate 3000 RSLCnano LCポンプ、HTC-PALオートサンプラー（CTC Analytics社製）を用いてLC/MS/MSで分析した。ペプチドは、Reposil-Pur 120 C18-AQ 3 μmを充填した逆相C18カラム（100 μm × 15 cm）で、500 nL/分の流速で5%から40% Bまでの20分間のリニアグラジエントを用いて分離した。質量分析計はDDAモードで動作し、サイクルタイムは1.5秒に設定した。プリカーサーイオンは、正規化コリジ

ョンエネルギー30でHCDによりフラグメンテーションされた。ペプチドは、SwissProt Human データベース (2019/10にアクセス) に対して、Mascot (バージョン2.7.0) を用いた自動データベース検索によって同定した。システインのカルバミドメチル化は固定修飾とした。メチオニン酸化は可変修飾とした。同定したペプチドとそのジアジリン修飾体 (+202.024164) の前駆体イオンピーク面積をSkyline-dailyを用いて定量した。1つのペプチドに対して1つのジアジリン修飾のみが許可されました。生のMSデータと解析ファイルは、ProteomeXchange Consortium のjPOSTパートナーリポジトリ (<https://jpostdb.org>) (47)に寄託した (ID : PXD054789)。

【Gai/13のGTPaseアッセイ】

Gai/13のGAPアッセイとGEFアッセイは、GTPase-Gloアッセイ (Promega, V7681) を用いて、製造元の指示に従って行った。アッセイは、2 μ MのタグなしGai/13、10 μ MのGST-p115-RH、10 μ MのmAAT-C末端ペプチド、10 μ MのGTP、10mMのDTTを含むGAPまたはGEFバッファー中、25°Cで120分間行った。発光は、マルチモードプレートリーダー/ARVOX3 (PerkinElmer) を用いて測定した。

【GSTプルダウンアッセイ】

GSTプルダウンアッセイでは、GST-p115-RHタンパク質 (33 μ g) を200 μ LのバッファーA (20 mM HEPES, 5 mM β ME, 1 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 10 μ M GDP, 0.1% C12E10, pH 8.0) 中で4°C 60分間穏やかに混合することにより、20 μ Lのグルタチオンセファロース4Bに結合させた。得られたGST-p115-RHビーズをバッファーAで洗浄し、AlF₄⁻ (30 μ M AlCl₃, 5mM MgCl₂, 5mM NaF) またはmAAT-C末端ペプチド存在下・非存在下でタグなしGai/13タンパク質 (2 μ g) と4°C、60分間インキュベートした。バッファーAで3回洗浄した後、ビーズを20 μ LのバッファーAに再懸濁し、SDSサンプルバッファーで煮沸した。

【ウェスタンブロット】

等量のタンパク質サンプルをSDS-PAGEにロードし、Immobilon-Pポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (ミリポア社製) に転写した。PVDF膜をBlocking-One (ナカライテスク) で60分間ブロッキングした。一次抗体をBlocking-Oneで希釈し、PVDF膜とO/N、4°Cでインキュベートした。TBSTで3回洗浄した後、膜をHRP標識二次抗体 (1 : 10,000、ヤギ抗マウス/ウサギ NA931V、NA934V ; Cytiva) と室温で60分間インキュベートし、TBSTで3回洗浄した後、化学発光試薬 (Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) またはWSE-7120LCP EzWestLumiplus (ATTO, 2332521)) で処理した。シグナルは、LAS 4000 mini imaging system (富士フイルム) またはChemiDoc™ Touch MP imaging system (バイオ・ラッド) で検出した。免疫反応バンドのデンストメトリーは、Vehicle処理サンプルをコントロールとして、ImageJソフトウェアを用

いて定量した。一次抗体には、抗GNA13抗体[EPR5436] (1:1,000、ab128900 ; Abcam) と抗RhoA抗体[EPR18134] (1:500、ab187027 ; Abcam) を用いた。

【細胞培養】

HeLa細胞は、10%ウシ胎児血清 (FCS) (SIGMA, 19G00F) と2mM L-グルタミン (Nacalai Tesque, 3953) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した。細胞培養は、37°C、5%CO₂の条件下で行った。

【RhoA活性アッセイ】

内在性RhoA活性を検出するために、HeLa細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) バッファーで3回洗浄し、1mM DTTと0.1M PMSFを含むPierce™ IP Lysis Buffer (Invitrogen, 87788) で溶解した。細胞溶解液を15,000rpm、4°Cで15分間遠心し、上清をグルタチオン-セファロース4BおよびGST-Rhotekin-RBDタンパク質 (2μg) (Cytoskeleton Inc.) と共に4°Cで120分間インキュベートした。Pierce™ IP Lysis Bufferで3回洗浄後、ビーズを20μL Pierce™ IP Lysis Bufferに再懸濁し、SDSサンプルバッファーで煮沸した。サンプルをSDS-PAGEにかけ、RhoA抗体を用いて免疫ブロッティングを行った。全細胞溶解液をローディングコントロールとして使用した。

【p115-RhoGEFの細胞膜移行アッセイ】

HeLa細胞 (2,000細胞/ウェル) を96ウェルガラス底培養プレート (IWAKI 1860-096) に蒔き、24時間後、PEI-MAXを用いて、mTurquoise2Δ9タグGα13 (Addgene社、#112930) とSYFP1-p115-RhoGEF (Addgene社、#112931) (48)を共導入した (Invitrogen社)。24時間培養後、培地を無血清培地に交換し、細胞をmAAT-C末端ペプチドで処理した。細胞をPBS緩衝液中4%パラホルムアルデヒドで固定し、Tris buffer(50 mM Tris、2 mM EGTA、2 mM MgCl₂、2 mM ジチオスレイトール (DTT) 、0.1 M フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) 、pH 8.5)+0.5% Triton X-100で室温15分間透過処理し、PBS緩衝液で洗浄した。その後、細胞をBlocking-Oneで室温60分間ブロッキングし、4',6-diamidino-2-phenylindole (1:1,000、D1306 ; Thermo Fisher Scientific) で核染色した。すべての画像は、Olympus FV3000共焦点顕微鏡とx40油浸対物レンズを用いて取得した。ランダム画像を撮影し、Olympus cellSense Count and Measureソフトウェアを用いて細胞膜と細胞質の輝度を分析した。すべての実験は少なくとも4回繰り返した。

【mAAT-C₁₋₁₇とGai/13のドッキングシミュレーション】

本実験は、共同研究者である松本篤幸准教授・奥野恭史教授 (京都大学大学院医学研究科)、Biao Ma研究員、金田亮研究員、井阪悠太研究員 (理化学研究所 (RIKEN) 計算科学研究センター)が実施した。Gai/13・GDP-mAAT-C₁₋₁₇ 複合体の MD シミュレーションの初期構造は、

HADDOCK2.4(49) を用いたドッキングシミュレーションにより作成した。Gai/13・GDPの入力構造はp115RhoGEF RGSドメインとの複合体結晶構造 (PDB entry: 3AB3) から得た。mAAT-C₁₋₁₇ のコンフォメーション空間は、拡張構造から T-REMD シミュレーションによって探索し、最も安定な 2つの構造を入力構造として採用した。T-REMDシミュレーションでは、298Kから500Kの温度範囲で102個のレプリカを使用し、2psごとにレプリカ交換を試みた。交換確率0.2を得るための温度セットは、REMDシミュレーション用温度ジェネレーターを用いて生成した(50)。各レプリカについて 30 ns のシミュレーションを行い、総シミュレーション時間は 3.06 μ s (30 ns $\times$ 102 レプリカ) とした。ドッキングシミュレーションでは、結合界面に関与すると推定される活性残基を、ジアジリンベースのタンパク質フットプリントデータに基づいて選択した。mAAT-C₁₋₁₇のすべての残基は完全に柔軟なセグメントとして設定した。得られたモデルはHADDOCKスコアに基づいてランク付けされ、最良のモデルをその後のMDシミュレーションの初期構造として採用した。

【MDシミュレーション】

本実験は、共同研究者である松本篤幸博士(京都大学大学院医学研究科)、Biao Ma研究員、金田亮研究員、井阪悠太研究員(理化学研究所(RIKEN) 計算科学研究センター)、奥野恭史博士(京都大学大学院医学研究科) が実施した。すべてのMDシミュレーションは、NVIDIA GeForce GTX 1080 GPU上で、GROMACS 2019.1 (51) により周期境界条件(PBC)を用いて実施した。水素原子はドッキングモデルに追加し、トポロジーファイルはGROMACS 2019.1のpdb2gmxモジュールを用いて生成した。GDPの静電ポテンシャルは、General Atomic and Molecular Electronic Structure System (GAMESS) プログラム (52) を用いてRHF/6-31G*レベルで計算し、その後、拘束静電ポテンシャル (RESP) アプローチ (53) により原子部分電荷を割り当てた。GDPのその他のパラメータは、AMBER Toolsのantechamberモジュールを用いて、一般的なAmber力場 (GAFF) によって決定した(54,55)。タンパク質とイオンにはAmber ff99SB-ILDN力場を用い(56)、水分子にはTIP3Pポテンシャルを用いた(57)。静電相互作用は、10 Åのカットオフ半径を持つ粒子メッシュEwald (PME) 法 (58) を用いて計算し、ファンデルワールス相互作用には10 Åの非結合カットオフを適用した。P-LINCSアルゴリズムは、すべての結合長を平衡値に拘束するために使用された(59)。完全に溶媒和したモデルのエネルギー最小化を行った後、得られた系を分子数・体積・温度一定 (NVT) 条件下で100ps平衡化し、続いて分子の重原子を固定した状態で分子数・圧力・温度一定 (NPT) 条件下で100ps実行した。温度は確率項(60)を用いた速度再スケーリングによって298Kに維持され、圧力はParrinello-Rahman圧力カップリング(61)を用いて1barに維持され、温度と圧力の時定数はそれぞれ0.1psと2psに設定された。その後、NPT条件下で3つの異なる初期速度で500nsの生成を行った。

第三章

結果

AAT-C末端ペプチドはGTP非依存的にGα13と標的タンパク質との結合を安定化させる

先行研究により、35アミノ酸からなるマウスSerpine A1b由来のAAT-C末端ペプチド (mAAT-C₁₋₃₅) が細胞膜を貫通し、細胞内でGα13と会合することが示された(18)。本研究では、Serpine A1タンパク質の中で最もよく研究されているマウスSerpine A1a由来のmAAT-C₁₋₃₅を用いた (Fig. 4(a))。mAAT-C₁₋₃₅によるGα13の制御機構を解析するために、小形公亮助教・石濱泰教授 (京都大学大学院薬学研究科) との共同研究により、アフィニティー精製質量分析法 (AP-MS) を用いて、in vitroでmAAT-C₁₋₃₅がGα13に直接結合するか調べた (Fig. 4(b))。Gα13リコンビナントタンパク質は不溶画分に集積することが知られているため、マウスGα13のN末端に存在するαNヘリックスをラットGαiのαNヘリックスに置換して水溶性を高め、さらにグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) を融合させたキメラタンパク質GST-Gαi/13タンパク質を精製した(43)。GST-Gαi/13タンパク質をベイトとして、GDPとmAAT-C₁₋₃₅存在下でAP-MSを実施した結果、コントロールタンパク質であるGST-PAK1-PBDに比べ、GST-Gαi/13・GDPではmAAT-C₁₋₃₅のピーク面積が有意に高かった。この結果から、mAAT-C₁₋₃₅とGαi/13・GDPが直接結合していることが示された (Fig. 4(b))。さらに、mAAT-C₁₋₁₇はGST-Gαi/13・GDPに結合するが、mAAT-C₁₈₋₃₅ (それぞれmAAT-C₁₋₃₅のN末端とC末端の半分) は結合しないことが観察された。これらの結果から、mAAT-C₁₋₃₅がそのN末端半分を介してGαi/13・GDPに直接結合することが明らかとなった。

(a)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
mAAT-C ₁₋₃₅	M	P	P	I	L	R	F	D	H	P	F	L	F	I	I	F	E	E	H	T	Q	S	P	I	F	L	G	K	V	V	D	P	T	H	K	
mAAT-C ₁₋₁₇	M	P	P	I	L	R	F	D	H	P	F	L	F	I	I	F	E																			
mAAT-C ₁₈₋₃₅																		E	H	T	Q	S	P	I	F	L	G	K	V	V	D	P	T	H	K	

(b)

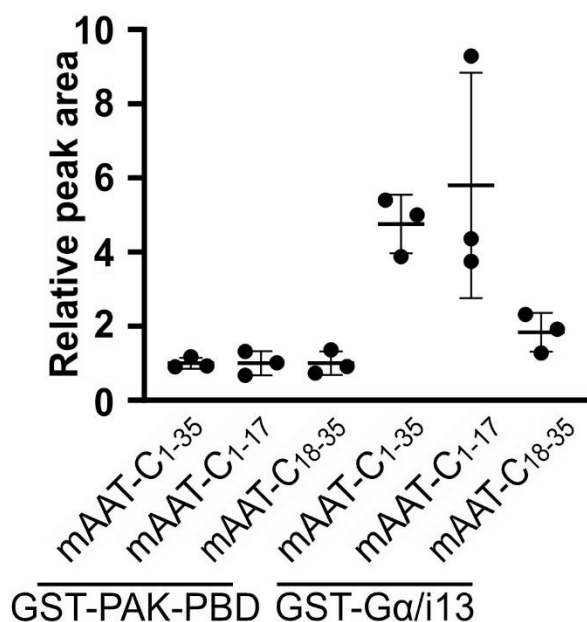
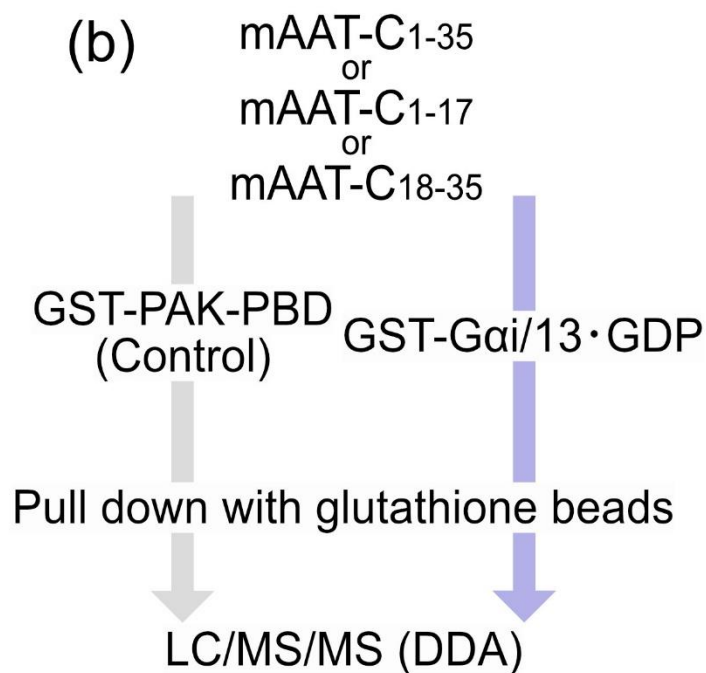


Fig. 4 Gα13とmAAT-C末端ペプチドの直接結合

(a) mAAT-C末端ペプチドのアミノ酸配列。

(b) AP-MSによるmAAT-C末端ペプチドとGST-Gαi/13タンパク質の結合解析。本実験は、共同研究者である小形公亮助教・石濱泰教授（京都大学大学院薬学研究科）が実施した。

mAAT-C₁₋₁₇はGai/13のGTPaseサイクルに影響を与える可能性は低い。

次に、mAAT-C₁₋₁₇がGai/13のGTPaseサイクルに影響を及ぼす可能性を調べた。この目的のために、Gタンパク質のGTPase活性、GAP活性、GEF活性を測定するための市販のアッセイキットであるGTPase Glo assay (Promega) を用いた(62, 63)。GTPase Glo assayは、Gα13のGTPaseサイクルの各ステップを特定するのには適していないと思われるが、GTPaseサイクル全体における目的分子の関与を評価するのには有用である。Gai/13のGTPアーゼ活性は、Gα13のGAPとして働くp115-RhoGEFのRHドメイン（アミノ酸残基：1-246）（p115-RhoGEF-RH）(37)の存在下で有意に増加したことから、このアッセイ系の有効性が確認された（Fig. 5(a)）。一方、GTPase/GAP反応バッファー（低Mg²⁺+EDTA）またはGEF反応バッファー（高Mg²⁺）のいずれを用いても、GST-Gai/13のGTPaseサイクルに対するmAAT-C₁₋₁₇の影響は検出されなかった（Fig. 5(b,c)）。これらの結果から、mAAT-C₁₋₁₇はGai/13のGTPaseサイクルに影響を与える可能性は低いことが示唆された。

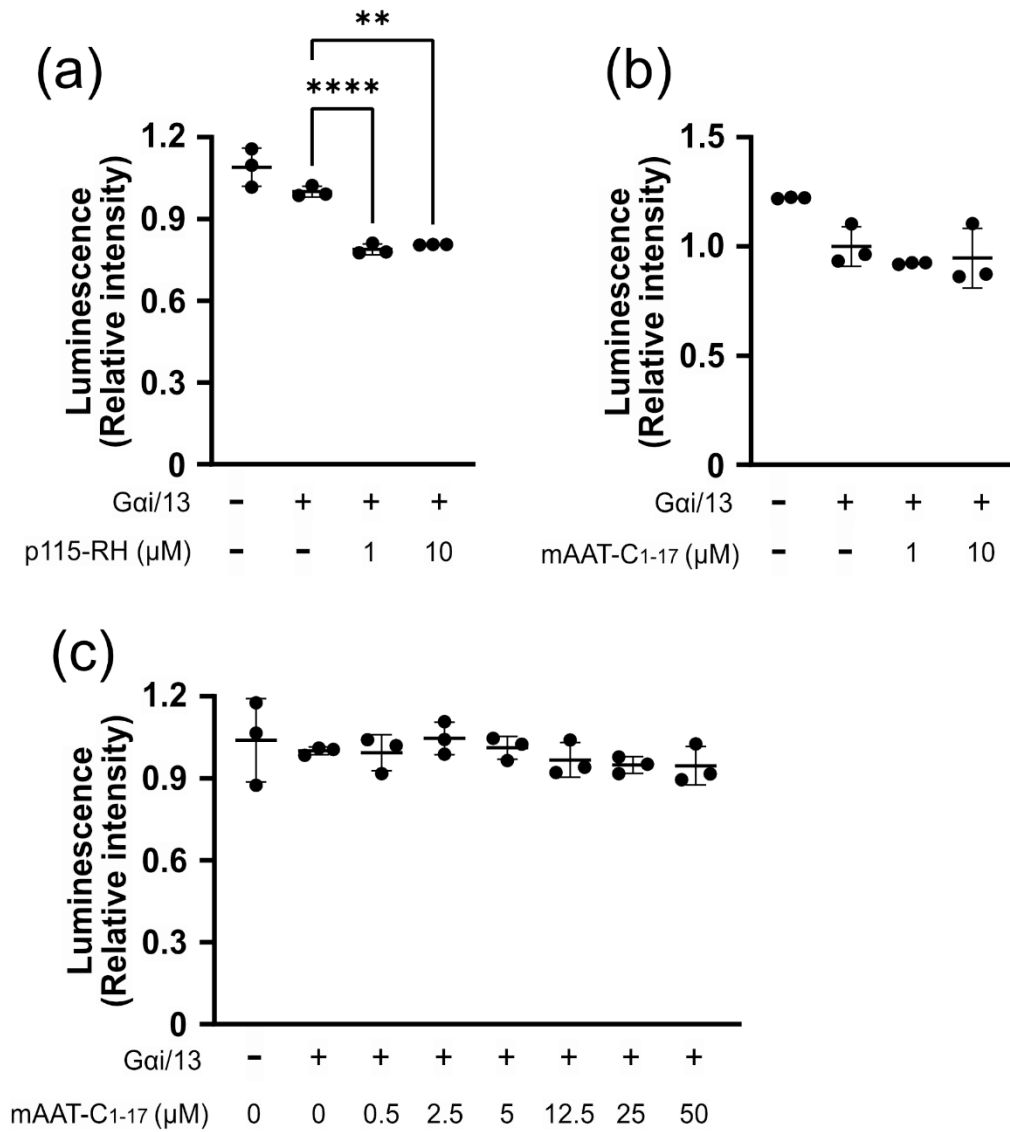


Fig. 5 mAAT-C₁₋₁₇はGai/13のGTPaseサイクルには影響しない

- (a) Gai/13のGTPase活性に対するp115-RHのGAP活性。タグなしGai/13タンパク質 (2μM) を、p115-RHタンパク質 (1μMまたは10μM) とプレインキュベートした。混合物を、10μM GTPと2mM DTTを含むGAP緩衝液中でインキュベートした (n=3独立サンプル)。
- (b) GAP緩衝液中でのGai/13 GTPaseサイクルに対するmAAT-C₁₋₁₇の効果。タグなしGai/13タンパク質 (2 μM) をmAAT-C₁₋₁₇ (2 μM) とプレインキュベートした。混合物を10μMのGTPと2mMのDTTを含むGAPバッファー中でmAAT-C₁₋₁₇ (1μMまたは10μM) とインキュベートした (n=3独立したサンプル)。
- (c) GEF緩衝液中でのGai/13 GTPaseサイクルに対するmAAT-C₁₋₁₇の効果。タグなしGai/13タンパク質(2 μM)を 10μMのGTPと2mMのDTTを含むGEPバッファー中で、mAAT-C₁₋₁₇存在下・非存在下でインキュベートした (n=3独立したサンプル)。

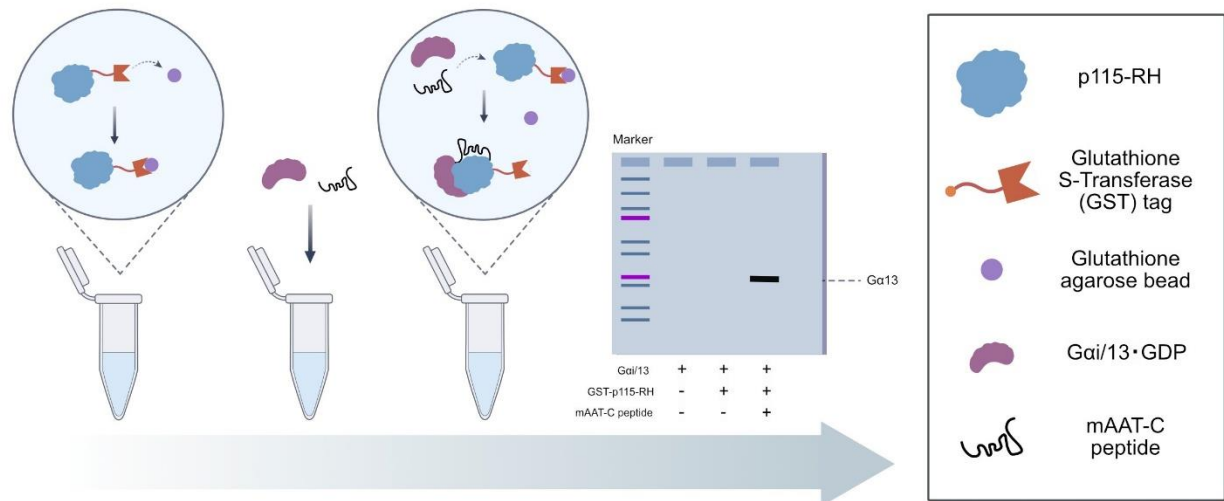
(a-c)はDunnnettの多重比較検定を用いて比較した。**p < 0.01, ****p < 0.0001。データは平均±S.Dで示した。

mAAT-C末端ペプチドはGTP非存在下でG α 13と標的タンパク質の結合を誘導する

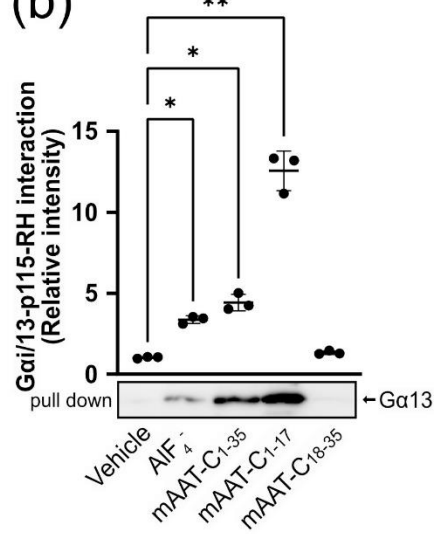
G α 13の標的タンパク質であるp115RhoGEFは、G α 13・GTPには結合するが、G α 13・GDPには結合しないことが知られている。しかし、mAAT-C₁₋₁₇はG α 13・GDPに結合することから、mAAT-C₁₋₁₇の結合がG α 13・GDPの構造変化を引き起こし、GTP非存在下でp115RhoGEFとの会合を誘導する可能性を調べた。このため、G α i/13・GDPとp115-RhoGEF-RHとの相互作用を、mAAT-C末端ペプチド存在下・非存在下においてGST-p115-RhoGEF-RHを用いたGSTプルダウンアッセイによって評価した (Fig. 6(a))。以前の研究(43, 64, 65)と同様に、G α の活性型構造を非特異的に誘導するフッ化アルミニウム(AlF₄)⁽⁶⁶⁾存在下において、G α i/13・GDP はp115-RhoGEF-RHと複合体を形成したことから、この評価系の有効性が確認された (Fig. 6(b), AlF₄)。そこで次に、AlF₄の代わりにmAAT-C末端ペプチドを反応混合物に加えた。その結果、mAAT-C₁₋₃₅またはmAAT-C₁₋₁₇存在下においてG α i/13とp115-RhoGEF-RHの複合体形成が誘導されたが、mAAT-C₁₈₋₃₅では誘導されなかった (Fig. 6(b))。

次に、mAAT-C₁₋₁₇の一連の欠失変異体を作成し、GSTプルダウンアッセイを実施した結果、mAAT-C₃₋₁₆がG α i/13・GDP とp115-RhoGEF-RHの複合体形成に必要な最小機能領域であることが分かった (Fig. 6(c),(d), (e))。これらの結果から、mAAT-C₁₋₃₅はそのN末端を介してG α 13・GDPと相互作用し、GTP非依存的にG α 13・GDPとそのエフェクタータンパク質の会合を誘導することが示された。

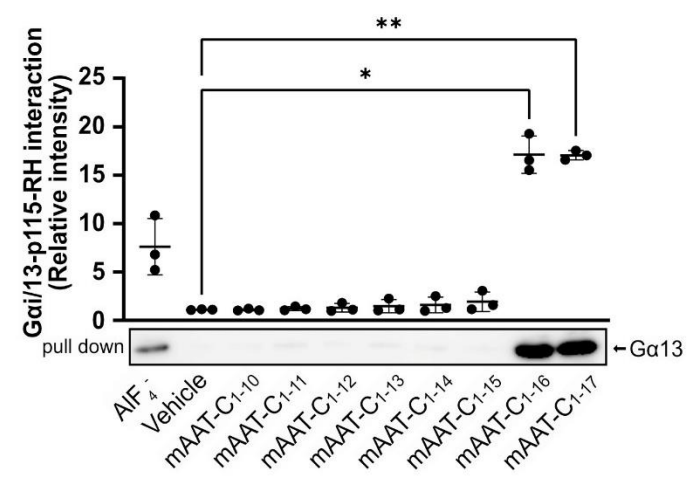
(a)



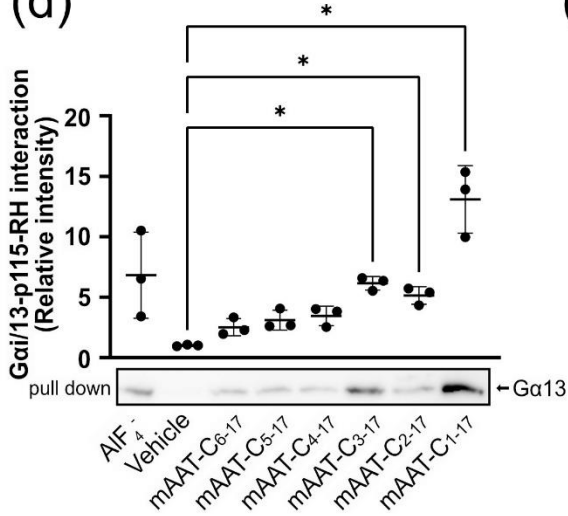
(b)



(c)



(d)



(e)

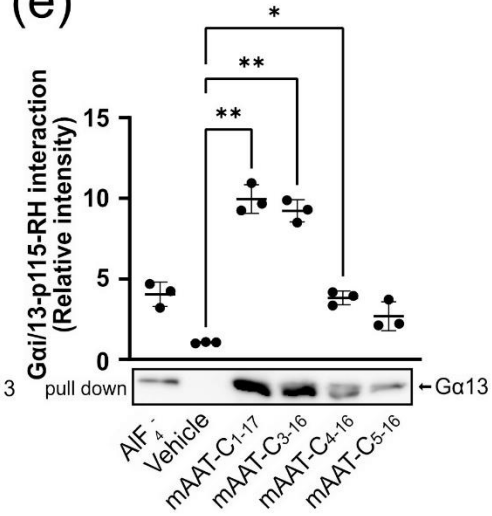


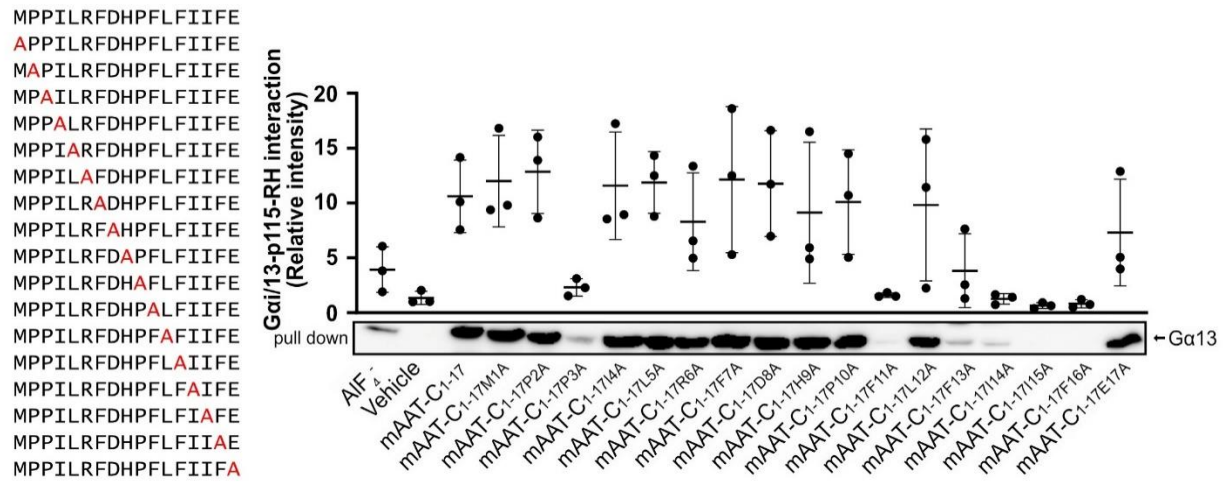
Fig. 6 AAT-C末端ペプチドはGTP非存在下でGα13・GDPとそのエフェクターとの結合を誘導する。

- (a) GST-p115-RHとGα13・GDPの結合を解析するためのGSTプルダウンアッセイの模式図。
 - (b) AlF₄またはmAAT-C末端ペプチド存在下におけるGST-p115-RHとG13・GDPのGSTプルダウンアッセイ。沈殿をGα13抗体で免疫ブロットした。Gαi/13バンドの相対的な濃度を定量化した (n=3独立サンプル)。
 - (c-e) 一連の欠失型mAAT-C末端ペプチド存在下におけるGST-p115-RH とGα13・GDPのGSTプルダウンアッセイ。Gαi/13バンドの相対的な濃度を定量化した (n=3独立サンプル)。
- (b-e)はDunnettの多重比較検定を用いて比較した。*p < 0.05, **p < 0.01。データは平均±S.Dで示した。

mAAT-C末端ペプチドのPhe11残基はGα13・GDPとp115-RhoGEF-RHの会合誘導に必須である

Gαi/13・GDP とp115-RhoGEF-RH の会合誘導に必須なmAAT-C₁₋₁₇のアミノ酸残基を同定するために、mAAT-C₁₋₁₇の各アミノ酸をAlaに置換したアラニンスキャンペプチドを合成し、GSTプルダウンアッセイにかけた。17アミノ酸残基のうち、Pro3、Phe11、Phe13、Ile14、Ile15またはPhe16をAlaで置換すると、Gαi/13・GDP とp115-RhoGEF-RHの会合誘導活性が低下した (Fig. 7(a))。これらのうち、Pro3、Phe11、およびPhe13は、5つのマウスSerpina1ファミリー (Serpina1a-e) とヒトAATで保存されており、Phe11をAlaに置換すると、Pro3やPhe13をAlaに置換するよりも会合活性が一貫して低下したことから (Fig. 7(a))、Phe11に焦点を絞って解析することとした。Phe11をAlaに置換したmAAT-C₁₋₃₅とmAAT-C₃₋₁₆変異体を設計し、さらにN末端にミニポリエチレングリコール (miniPEG) [H₂N(CH₂CH₂O)₂CH₂CO-] を付加して水溶性を高めた (Fig. 7(b))。GSTプルダウンアッセイの結果、miniPEG-mAAT-C₁₋₃₅F11AおよびminiPEG-mAAT-C₃₋₁₆F11Aは、コントロールであるminiPEG-mAAT-C₁₋₃₅およびminiPEG-mAAT-C₃₋₁₆に比べ、Gαi/13・GDP とp115-RhoGEF-RHの会合誘導活性が低下していることが示された (Fig. 7(c), (d))。これらの結果から、mAAT-C末端ペプチドのPhe11がGα13・GDPとp115-RhoGEF-RHの会合を誘導する上で必須のアミノ酸残基であることが分かった。

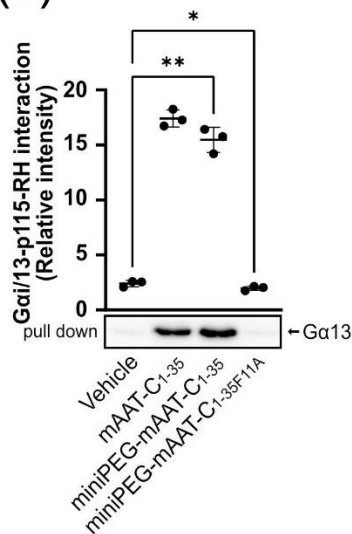
(a)



(b)

mAAT-C₁₋₃₅ MPPILRFDHPFLFIIFEHTQSPIFLGKVVDPTHK
 miniPEG-mAAT-C₁₋₃₅ XMPPILRFDHPFLFIIFEHTQSPIFLGKVVDPTHK (X=miniPEG)
 miniPEG-mAAT-C_{1-35F11A} XMPPILRFDHPFLFIIFEHTQSPIFLGKVVDPTHK (X=miniPEG)
 miniPEG-mAAT-C₃₋₁₆ XPILRFDHPFLFIIFE (X=miniPEG)
 miniPEG-mAAT-C_{3-16F11A} XPILRFDHPFLFIIFE (X=miniPEG)

(c)



(d)

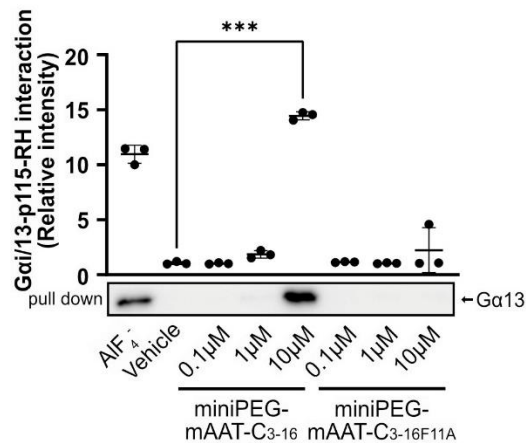


Fig. 7 mAAT-C末端ペプチドのPhe11残基はGα13・GDPとp115-RhoGEF-RHの結合誘導に必須である。

(a) mAAT-C₁₋₁₇のアラニンスキャンペプチドを用いたGα13・GDPおよびGST-p115-RHのGSTプルダウンアッセイ。Gai/13バンドの相対的な濃度を定量化した (n=3独立サンプル)。

(b) miniPEG-mAAT-C末端ペプチドのアミノ酸配列。

(c-d) miniPEG-mAAT-C末端ペプチドを用いたGα13・GDPおよびGST-p115-RHのGSTプルダウンアッセイ。Gai/13バンドの相対的な濃度を定量化した (n=3独立サンプル)。

データは平均±S.Dで示した。

(a), (c), (d)はDunnnettの多重比較検定を用いて比較した。*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

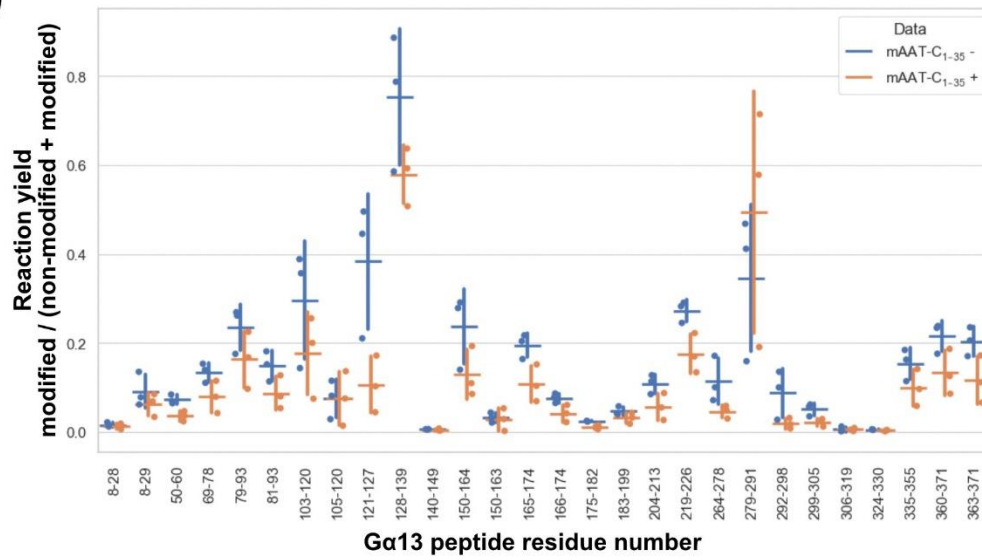
miniPEG = H₂N(CH₂CH₂O)₂CH₂CO.

Gai/13・GDPへのmAAT-C₁₋₁₇の結合は、Gai/13の活性型構造を安定化させる

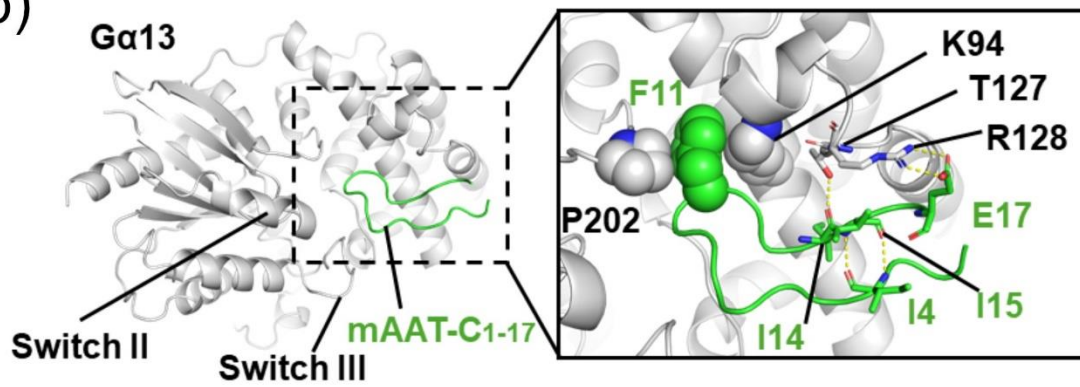
Gai/13・GDPとp115-RhoGEF-RHがmAAT-C₁₋₁₇によって会合する分子機構を解明するため、Gai/13・GDPとmAAT-C₁₋₁₇の複合体構造について分子動力学（MD）シミュレーションを行った。まず、共同研究者の小形公亮助教・石濱泰教授（京都大学大学院薬学研究科）は、GST-ヒトGα13とSerpin A1b由来のmAAT-C₁₋₃₅を用いて、mAAT-C₁₋₃₅の結合によって変化するGα13上のアクセス可能なタンパク質表面を同定するため、ジアジリンベースのタンパク質フットプリントを実施した（67）（Fig. 8(a)）。GST-ヒトGα13をmAAT-C₁₋₃₅存在下・非存在下においてジアジリン反応液で処理し、その後トリプシン処理して、得られた各トリプシン消化ペプチドのジアジリンラベル率を質量分析で定量化した。その結果、Gα13から同定された28個のジアジリンラベルされたトリプシン消化ペプチドのうち、26個について、mAAT-C₁₋₃₅ペプチド存在下でジアジリンラベル率が低下する傾向が認められた（Fig. 8(a)）。このうち、有意な減少（ $p < 0.05$ ）が認められた6ペプチドは、それぞれヒトGα13のアミノ酸残基50-60、121-127、165-174、175-182、219-226、299-305に相当する領域であった。そこで、この6領域を以降のMDシミュレーションの相互作用候補領域として組み入れることとした。

次に、共同研究者の松本篤幸准教授・奥野恭史教授（京都大学大学院医学研究科）、Biao Ma 研究員、金田亮研究員、井阪悠太研究員（理化学研究所（RIKEN）計算科学研究センター）は、HADDOCK2.4(68)を用いてGai/13・GDP-mAAT-C₁₋₁₇複合体のMDシミュレーションを実施した。その結果、Gai/13・GDP-mAAT-C₁₋₁₇複合体ドッキングモデルでは、mAAT-C₁₋₁₇が中央のPhe11を中心に曲がったコンフォメーションをとり、Gai/13の活性型構造にかかわる3つのスイッチ領域（スイッチI, Leu198-His207; スイッチII, Val223-Ser239; スイッチIII, Gln254-Asn263）に囲まれた領域に結合することが分かった（Fig. 8(b)）。mAAT-C₁₋₁₇の曲がったコンフォメーションは、Ile4とIle14、Ile4とIle15の間の分子内水素結合によって安定化されていた。また、Gai/13への結合は、mAAT-C₁₋₁₇のPhe11とGai/13のスイッチIのPro202およびαA2らせんのLys94との疎水的相互作用、mAAT-C₁₋₁₇のIle14とGai/13のThr127との水素結合、mAAT-C₁₋₁₇のGlu17とGai/13のArg128とのイオン結合からなる分子間相互作用によって安定化されていた。このドッキングモデルを既報のGai/13とp115-RhoGEF RH複合体の結晶構造（PDB entry: 3AB3）に重ね合わせると、mAAT-C₁₋₁₇のGai/13上の結合部位は、p115-RhoGEF RHのN末端領域が結合する部位とオーバーラップしていた（Fig. 8(c)）。p115-RhoGEF RHのN末端領域は、Gai/13とp115-RhoGEF RHとの複合体形成には必須でないが、両者の結合を促進する効果が報告されている（39）。このことから、mAAT-C₁₋₁₇は同領域に結合することで、Gai/13とp115-RhoGEF RHの結合を促進することが示唆された。さらに、p115-RhoGEF RHのN末端領域を欠失したp115-RhoGEF RH-ΔNとGai/13の会合もmAAT-C₁₋₁₇によって誘導されたことから、この仮説が支持された（Fig. 8(d)）。

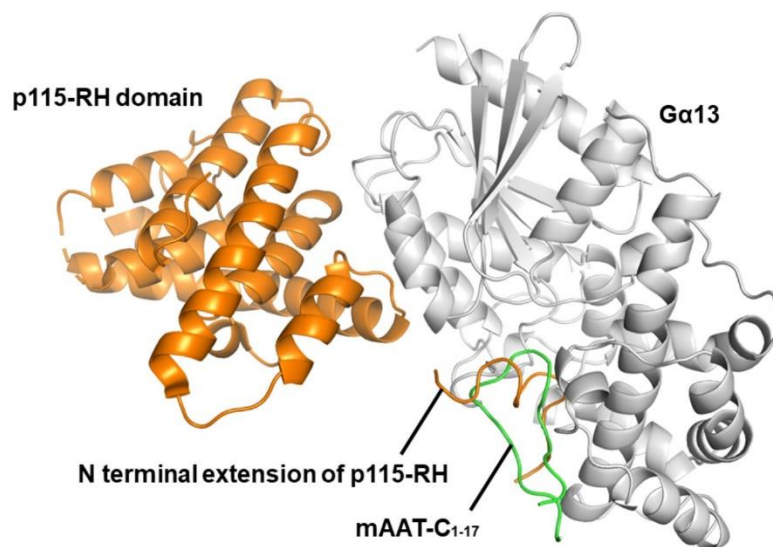
(a)



(b)



(c)



(d)

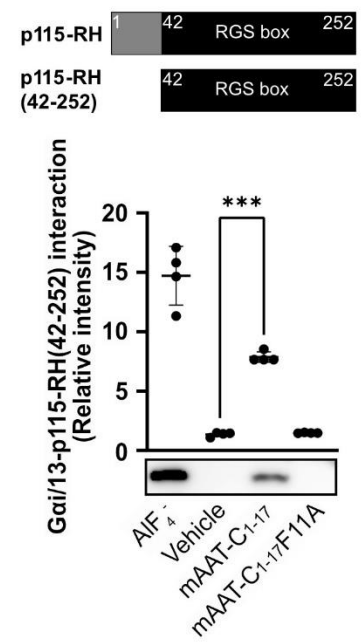


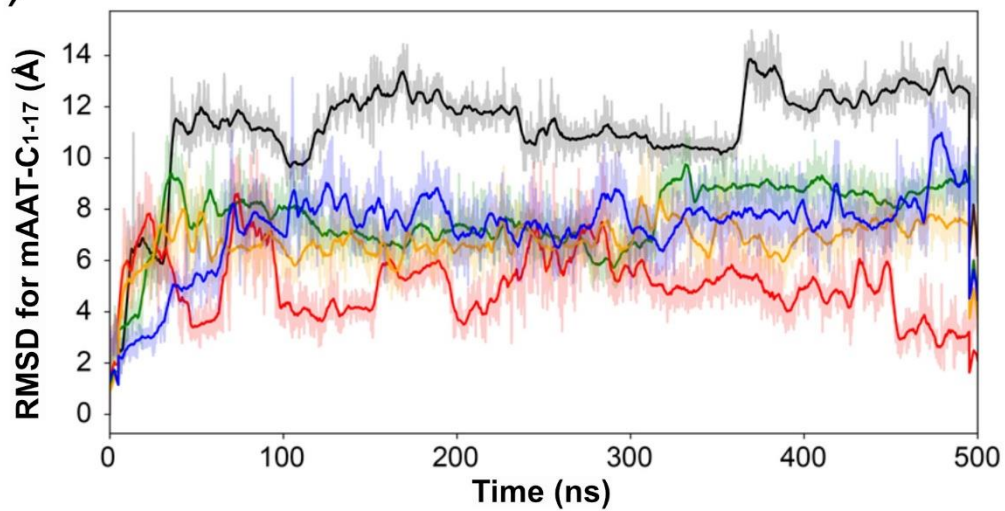
Fig. 8 mAAT-C₁₋₁₇とGα13・GDPの複合体構造のMDシミュレーション

- (a) ヒトGα13とSerpA1b-mAAT-C₁₋₃₅のジアジリンベースタンパク質フットプリンティング。ジアジリンを用いたフットプリンティングの反応収率は、ジアジリン修飾ペプチドと対応する非修飾ペプチドの定量ピーク面積によって計算した。本実験は、共同研究者である小形公亮助教・石濱泰教授（京都大学大学院薬学研究科）が実施した。
- (b) mAAT-C₁₋₁₇とGα13・GDPのドッキングモデル。左の図はドッキングモデルの全体図、右の図は全体図の破線の四角で示した領域のクローズアップ図である。クローズアップ図では、水素結合相互作用を形成する残基と疎水性相互作用を形成する残基を棒と球のモデルで示した。水素結合相互作用は黄色の破線で示されている。本実験は、松本篤幸博士（京都大学大学院医学研究科）、Biao Ma研究員、金田亮研究員、井阪悠太研究員（理化学研究所（RIKEN）計算科学研究センター）、奥野恭史博士（京都大学大学院医学研究科）が実施した。
- (c) Gα13-mAAT-C₁₋₁₇複合体モデルとGαi/13・GDP・AlF₄⁻p115-RhoGEF-RH複合体（PDBエントリー3AB3）の結晶構造の重ね合わせ。Gα13、mAAT-C₁₋₁₇、p115-RHはそれぞれ灰色、緑色、オレンジ色で示されている。本実験は、松本篤幸博士（京都大学大学院医学研究科）、Biao Ma研究員、金田亮研究員、井阪悠太研究員（理化学研究所（RIKEN）計算科学研究センター）、奥野恭史博士（京都大学大学院医学研究科）が実施した。
- (d) p115-RHとp115-RH(42-252)の模式図（上）。AlF₄⁻またはmAAT-C末端ペプチドを用いたGST-p115-RH(42-252)へのGα13・GDPのGSTプルダウンアッセイ（下）。沈殿をGα13抗体で免疫ブロットした。Gαi/13バンドの相対的な濃度を定量化した（n=3独立サンプル）。データは平均±S.Dで示した。
- (d)はDunnnettの多重比較検定を用いて比較した。***p < 0.001

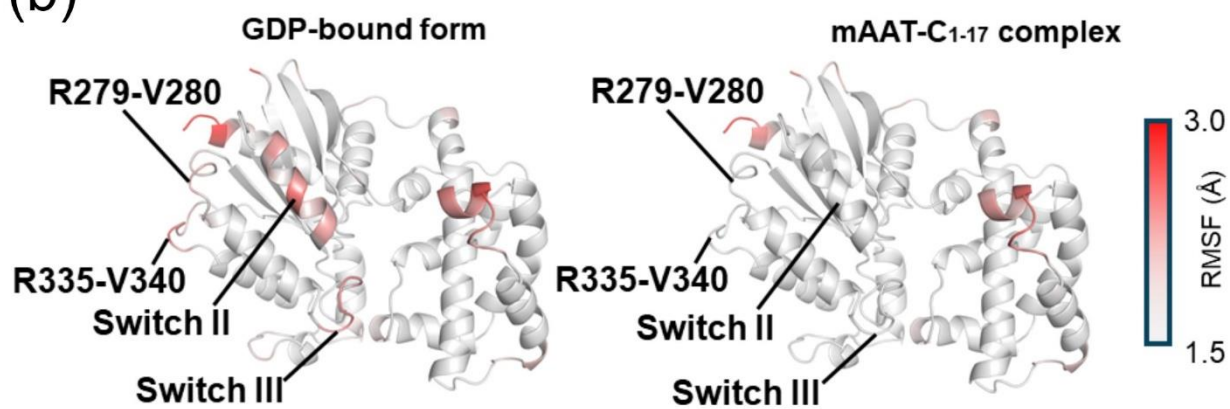
mAAT-C₁₋₁₇の結合は、Gai/13のスイッチ領域の活性コンフォメーションとp115-RhoGEF-RHとの界面を安定化させる。

次に、共同研究者の松本篤幸准教授・奥野恭史教授（京都大学大学院医学研究科）、Biao Ma 研究員、金田亮研究員、井阪悠太研究員（理化学研究所（RIKEN）計算科学研究センター）は、ドッキングモデルを初期構造として、5つの異なる初期速度で500ナノ秒のMDシミュレーションを行った。mAAT-C₁₋₁₇の二乗平均平方根偏差（RMSD）解析から、結合したペプチドはシミュレーションの全期間中、Gai/13・GDPと結合したままであることが示され、ドッキング構造が安定であることが示された（Fig. 9(a)）。Gai/13・GDPに対するmAAT-C₁₋₁₇結合の影響を調べるため、mAAT-C₁₋₁₇非存在下でGai/13・GDPの500ナノ秒MDシミュレーションを行い、複合体の動的挙動と比較した。二乗平均平方根ゆらぎ（RMSF）解析の結果、mAAT-C₁₋₁₇の結合によって、活性化構造の保持に不可欠なスイッチIIおよびIII領域の構造不安定性が低下し、活性型構造が安定化されていることが示された（Fig. 9(b)）。スイッチ領域に加えて、p115-RHドメインの結合界面に位置する残基であるArg279-Val280とArg335-Val340の不安定性もmAAT-C₁₋₁₇の存在下で安定化された。Gai/13内で形成された水素結合相互作用の平均数を見ると、p115-RHドメインを認識する領域に位置するArg279とAsp336の間の相互作用が、シミュレーション中にmAAT-C₁₋₁₇の存在下で頻繁に形成されていた（Fig. 9(c)）。Arg279とAsp336間の水素結合相互作用は、RMSF解析で観察されたRHドメインの結合界面における安定化に寄与すると考えられる。また、これらの観察から、Gai/13では、スイッチ領域が下流のエフェクターを認識する空間的に離れた領域と動的につながっているという重要な構造的性質が明らかになった。これまでの研究で、スイッチ領域、特にスイッチIIはGai/13・GDPでは可変的なコンフォメーションをとり、活性型Gai/13（Gai/13・GDP・AlF₄⁻）では安定化されることが示されている(43, 68)。MDシミュレーションで観察された挙動から、mAAT-C₁₋₁₇の結合は、Gai/13の活性型コンフォメーションに必須なスイッチ領域の安定化と、連動するRHドメイン結合領域を安定化することにより、Gai/13・GDPと下流の標的タンパク質との会合を促進することが示された。

(a)



(b)



(c)

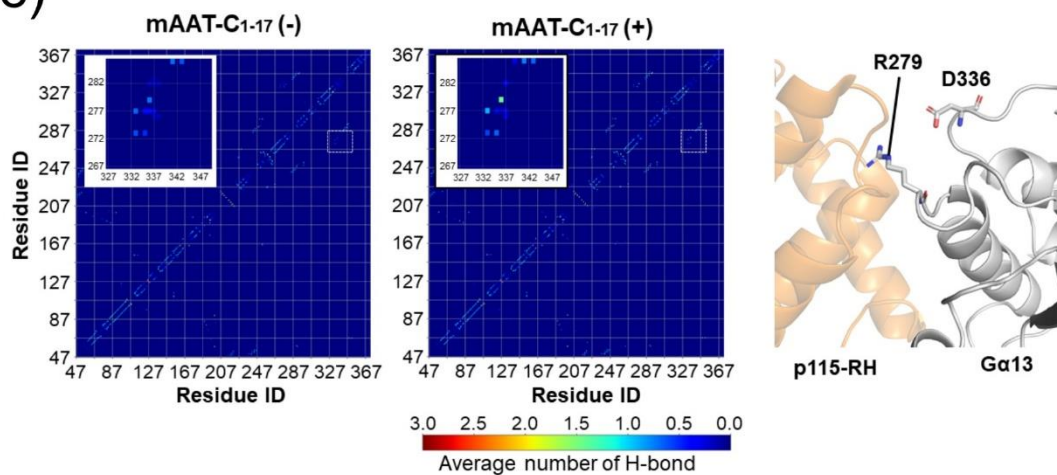


Fig. 9 mAAT-C₁₋₁₇はGα13の活性型構造を安定化させる。

本実験は全て、松本篤幸博士（京都大学大学院医学研究科）、Biao Ma研究員、金田亮研究員、井阪悠太研究員（理化学研究所（RIKEN）計算科学研究センター）、奥野恭史博士（京都大学大学院医学研究科）（a-c）が実施した。

- (a) Gα13と複合体化したmAAT-C₁₋₁₇のRMSD値。RMSD値は、500 nsの長さの5つの独立したシミュレーションからmAAT-C₁₋₁₇のCa原子について計算された。5つのシミュレーションは異なる初期速度で行われ、それぞれ異なる色で示されている。5nsウィンドウの平均値を太線で示した。
- (b) Gα13の3次構造（PDBエントリー3AB3）へのRMSF値のマッピング。RMSF値は灰色（1.5Å）から赤色（3.0Å）へのカラースケールで表示した。
- (c) Gα13内の水素結合相互作用。水素結合相互作用の数は、Gα13内で形成された全ての残基ペアについて計算した。mAAT-C₁₋₁₇の非存在下（左パネル）と存在下（中央パネル）のすべてのMD軌道の平均を、青（低い）から赤（高い）へのカラースケールで表示した。横軸と縦軸はアミノ酸残基数を表す。挿入図は、全体のヒートマップで破線の長方形で示した領域の拡大図である。右のパネルは、Gα13とp115-RHの界面のクローズアップ図である。Gα13とp115-RHはそれぞれ灰色と橙色で表示した。mAAT-C₁₋₁₇存在下で誘導される、安定な水素結合を形成するGα13のArg279とAsp336は、棒モデルで示した。

mAAT-C₁₋₃₅は細胞内でGα13-RhoAシグナル伝達経路を活性化する

細胞内でGα13が活性化すると、p115-RhoGEF-RHが細胞膜に移行する(69)。細胞内におけるmAAT-C₁₋₃₅のGα13活性化能を評価するために、YFPタグ付きp115-RhoGEF-RHとmTurquoise2Δ9タグ付きGα13をコードするプラスミドをHela細胞にトランスフェクションし(48)、mAAT-C₁₋₃₅で処理した後にYFP-p115-RhoGEF-RHの細胞膜移行を計測した。mAAT-C₁₋₃₅またはminiPEG-mAAT-C₁₋₃₅で細胞を処理したところ、処理後5分以内にYFP-p115-RhoGEF-RHの細胞膜への移行が観察された (Fig. 10(a-d))。次に、内在性のRhoAの活性を測定するため、Rho-Aの標的タンパク質であるRhotekinのRho結合ドメイン (RBD) にGSTを融合させたGST-RBDタンパク質を用いたGSTプルダウンアッセイを実施した。その結果、mAAT-C₁₋₃₅およびminiPEG-mAAT-C₁₋₃₅で処理した細胞では、内在性のRhoAが活性化することが分かった (Fig. 10(e), (f))。これに対し、miniPEG-mAAT-C₁₋₃₅F11Aは、p115-RhoGEF-RHの細胞膜への移行 (Fig. 10(c), (d))、ならびにRhoAの活性化 (Fig. 10(f)) は誘導しなかった。これらの結果は、mAAT-C₁₋₃₅が細胞内でGα13-RhoAシグナルを活性化すること、この機能にはmAAT-C₁₋₃₅のPhe11残基が重要であることを示している。なお、*in vitro*におけるGαi/13活性化に必要な最小機能配列であるmAAT-C₃₋₁₆は、p115-RhoGEF-RHの細胞膜への移行 (Fig. 10(c), (d)) やRhoAの活性化 (Fig. 10(f)) は誘導できなかった。この結果から、*in vivo*におけるGα13シグナルの活性化には、mAAT-C₃₋₁₆以外の領域も必要であることが示唆された。

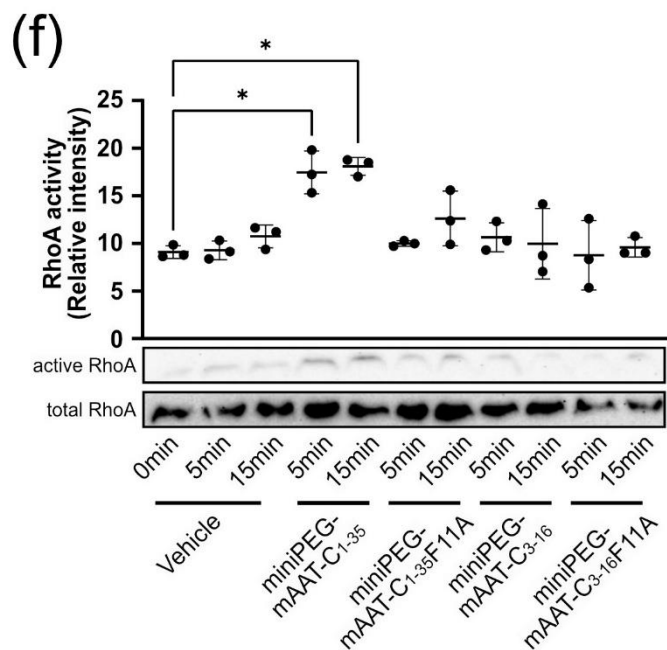
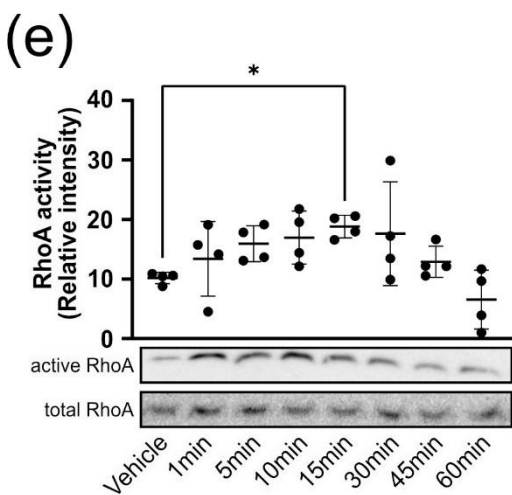
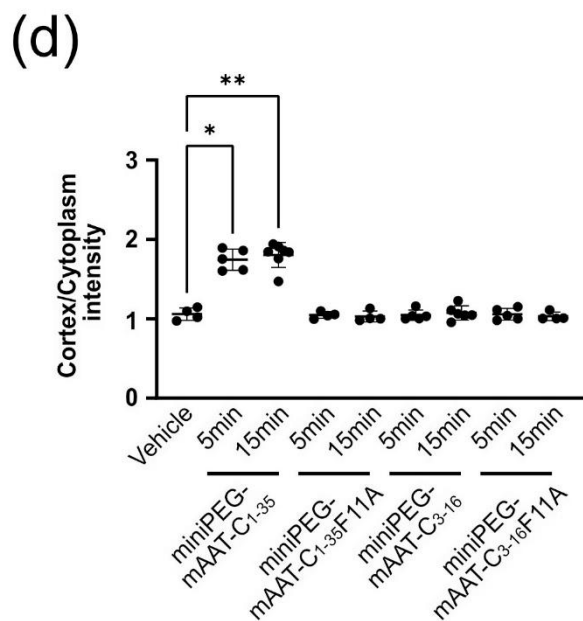
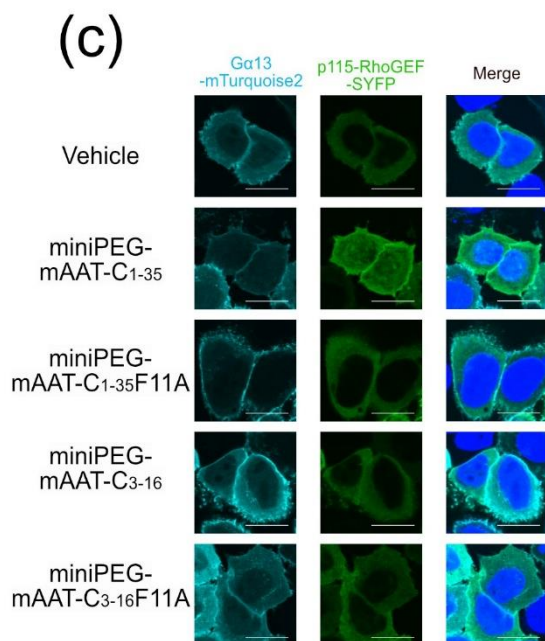
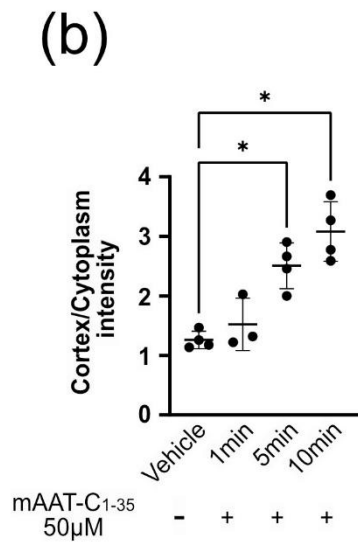
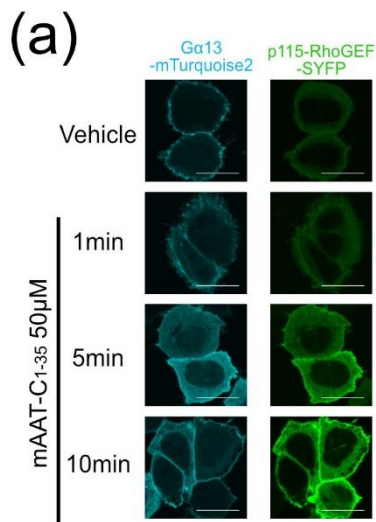


Fig. 10 mAAT-C₁₋₃₅は細胞内でGα13-RhoAシグナル伝達経路を活性化する

- (a) p115-RhoGEFの細胞膜移行アッセイ。Gα13-mTurquoise2およびSYFP1-p115-RhoGEFをトランスフェクトしたHeLa細胞を、mAAT-C₁₋₃₅ (50μM) で処理した。
- (b) p115-RhoGEFの細胞膜移行(a)の定量化。SYFP1-p115-RhoGEFの細胞質強度に対する細胞表層強度を示す。各ポイントは11-14細胞/サンプルの平均を表す。(n=3または4つの独立した実験)。
- (c) miniPEG-mAAT-C末端ペプチド (50μM) で処理した細胞におけるp115-RhoGEFの細胞膜移行アッセイ。
- (d) p115-RhoGEFの細胞膜移行(c)の定量化。SYFP1-p115-RhoGEFの細胞質強度に対する細胞表層強度を示す。各ポイントは14-21細胞/サンプルの平均を表す。(n>4独立実験)。
- (e-f) GST-Rhotekin-RBDプルダウンアッセイによる内在性RhoAの活性測定。mAAT-C₁₋₃₅ (50μM) (e) またはminiPEG-mAAT-C末端ペプチド (50μM) (f) で処理したHeLa細胞を溶解し、細胞溶解物をGST-Rhotekin-RBDプルダウンアッセイにかけた (活性型RhoA)。全細胞溶解液はローディングコントロールとして用いた (総RhoA)。活性型RhoAバンドの相対的な濃度を定量化した (n=3または4独立サンプル)。
データは平均±S.Dで示した。スケールバーは20μm。
- (b), (d), (e), (f)はDunnettの多重比較検定を用いて比較した。*p < 0.05, **p < 0.01

第四章

考察

本研究では、AAT-C末端ペプチドがGα13シグナルを調節するメカニズムを解明した。一連の変異型AAT-C末端ペプチドの活性評価とMDシミュレーションを組み合わせた構造活性相関解析により、AAT-C末端ペプチドによるGPCR非依存的なGα13の構造制御という、これまで知られていなかったメカニズムが明らかになった。mAAT-C末端ペプチドはGα13・GDPと結合し、それによってGTP非存在下でスイッチ領域とエフェクター結合領域の活性型コンフォメーションを安定化する。このシナリオは、GPCRとは独立してGαi・GDPと結合し活性化するGIV/GirdinのGEMモチーフペプチドで観察されたものと類似している(40,41)。しかしその作用機序は異なっており、GIV-GEMモチーフペプチドがGαiのスイッチII領域とα3-ヘリックスと相互作用する(70,71)。一方、mAAT-C₁₋₁₇はスイッチI領域とαA2-ヘリックスの間の疎水性ポケットに挿入され、Gα13のαBとαB1-ヘリックスの間のらせん挿入領域に接触する。また、mAAT-C₁₋₁₇の結合はGα13のスイッチII領域の活性型コンフォメーションを安定化させるが、Gα13のGTPaseサイクルに関しては効果が観察されなかった。すなわち、GIV-GEMモチーフペプチドとは異なり、mAAT-C₁₋₁₇によるGα13のヌクレオチド交換やGTP加水分解への影響は限定的であり、その作用点はGα13・GDPと下流のエフェクターとの直接的な結合促進であると推定される。

mAAT-C末端ペプチドはGα13・GDPと結合し、GTP非存在下で下流のエフェクターとの直接的な結合を促進させたが、Gα13・GTPに対する効果は不明である。GTPの結合は、Gα上の3つのスイッチ領域のコンフォメーション変化を引き起こし、活性型構造が安定化される。既に安定化されているGα13・GTPへmAAT-C末端ペプチドがどのような作用をするか、mAAT-C末端がGα13・GTPと下流のエフェクターのタンパク質が相互作用する領域とオーバーラップすることで阻害する可能性も含め検証する必要がある。また、mAAT-C末端ペプチドの作用がGα13特異的であるかも検証を要する。本研究では、mAAT-C末端ペプチドによるGα13・GDPとエフェクタータンパク質との会合誘導を明らかにしたが、他のGαサブユニットであるGas、Gai/o、Gaq/11サブファミリーに対しても各エフェクタータンパク質との会合を促進するかは不明である。各Gαサブファミリーとエフェクタータンパク質を用いたin vitro会合実験や細胞膜移行アッセイ等によって特異性を検証することが今後の課題である。

mAAT-C末端ペプチドとGα/Gβ1/Gγ2三量体形成との関連の解明も課題としてあげられる。ドッキングモデルにおけるmAAT-C₁₋₁₇の結合部位は、Gβ1/Gγ2サブユニットの結合部位とは重ならないが、Gai/13とGβ1の界面であるスイッチII領域は、mAAT-C₁₋₁₇の存在下では、非存在下と比較して異なるコンフォメーションをとっていた。この観察から、Gβ1/Gγ2サブユニットは、Gai/13・GDP-mAAT-C₁₋₁₇複合体には結合できないと予測される。この仮説を評価するためには、生化学的および細胞生物学的な検証が必要である。また、mAAT-C₁₋₁₇がGα13/Gβ/Gγヘテロ3量体に結合してGα13とGβ/Gγの解離を誘導するか、あるいはmAAT-C₁₋₁₇がGβ/Gγにアクセス

できるようにするにはGα13を事前にGβ/Gγから解離させる必要があるかを検証することも重要と考えられる。

Gai/13・GDP-mAAT-C₁₋₁₇ 複合体ドッキングモデルを裏付けるデータを追加するのも今後の重要な課題の一つである。ドッキングモデルの結果(Fig. 8(b))、Gai/13への結合には、mAAT-C₁₋₁₇のPhe11、Ile14、Glu17が必要であることが明らかとなった。しかし、この結果はアラニンスキャンペプチドを用いたプルダウンアッセイ (Fig. 7(a)) と完全には一致していない。例えば、ドッキングモデルにおいてGai/13結合に重要なmAAT-C₁₋₁₇のGlu17は、アラニンに置換しても会合活性を維持していた。恐らく、mAAT-C₁₋₁₇のGlu17とGai/13のArg128とのイオン結合が無くとも、他の化学結合によってmAAT-C₁₋₁₇とGai/13・GDPの結合が維持されると予想されるが、定量的に明確にする必要がある。さらに、mAAT-C₁₋₁₇に結合するGai/13側の必須アミノ酸残基をもとに、変異型Gai/13を作成し、mAAT-C₁₋₁₇との分子間相互作用も観察する必要もある。これらの変異型Gai/13と変異型mAAT-C₁₋₁₇を用いた分子間相互作用をKD値（解離定数）として定量化すると共に、最終的には結晶構造解析による証明が必要である。

最小機能領域 (mAAT-C₃₋₁₆) は、Gai/13をin vitroで活性化したにもかかわらず、細胞培養液に添加した場合は細胞内のGα13を活性化することができなかった。この結果は、in vivoにおけるGα13の活性化には、mAAT-C₃₋₁₆以外の領域も必要であることを示している。先行研究において、mAAT-C₁₋₃₅は細胞膜を透過することが観察されている(21)。恐らく、この細胞膜透過に必要な領域が、mAAT-C₃₋₁₆以外の領域に存在すると予想される。これを検証するためには、mAAT-C末端ペプチドを可視化して細胞局在を検証し、mAAT-C₃₋₁₆が細胞膜に透過できないことを示す必要がある。タグや蛍光色素で標識したmAAT-C₃₋₁₆とmAAT-C₁₋₃₅で細胞を処理し、細胞局在を可視化する等の方法が考えられる。生体内には長さの異なる複数のAAT-C末端ペプチドが存在し、それぞれ機能が異なることが報告されている。これらの機能の相違は、膜透過性の有無によって説明できるかもしれない。

本研究で用いた、Gα13とmAAT-C末端ペプチドはマウス由来であり、ヒトのアミノ酸配列とは完全には一致していない。このため、今回得られた複合体ドッキングモデルはヒト配列では適用しない可能性も考えられる。医療の応用を見据え、ヒト配列を用いた検証が今後の重要な課題である。SERPINA1突然変異によるAAT欠損症の患者は、肺気腫や慢性閉塞性肺疾患といった慢性肺疾患を呈する。AATDの病因におけるmAAT-C末端ペプチド-Gα13軸の関与の可能性を検証することが、今後の取り組むべき課題である。

参考文献

1. Gabay, C., and Kushner, I. (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* **340**, 448–454
2. Stockley, R. A. (2014) Alpha1-antitrypsin review. *Clin. Chest. Med.* **1**, 39–50
3. Chua, F., and Laurent, G. J. (2006) Neutrophil elastase: Mediator of extracellular matrix destruction and accumulation. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **3**, 424–427
4. Pham, C. T. (2006) Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 541–550
5. Bergin, D. A., Reeves, E. P., Hurley, K., Wolfe, R., Jameel, R., Fitzgerald, S., and McElvaney, N. G. (2014) The circulating proteinase inhibitor α -1 antitrypsin regulates neutrophil degranulation and autoimmunity. *Sci. Transl. Med.* **6**, 217
6. Greene, C. M., Marciniak, S. J., Teckman, J., Ferrarotti, I., Brantly, M. L., Lomas, D. A., Stoller, J. K., and McElvaney, N. G. (2016) α 1-Antitrypsin deficiency. *Nat. Rev. Dis. Primers.* **2**, 16051
7. Huntington, J. A., Read, R. J., and Carrell, R. W. (2000) Structure of a serpin–protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* **407**, 923–926
8. Bigalke, A., Sponholz, C., Schnabel, C., Bauer, M., and Kiehntopf, M. (2022) Multiplex quantification of C-terminal alpha-1-antitrypsin peptides provides a novel approach for characterizing systemic inflammation. *Sci. Rep.* **12**, 3844
9. Johansson, J., Gröndal, S., Sjövall, J., Jörnvall, H., and Curstedt, T. (1992) Identification of hydrophobic fragments of alpha 1-antitrypsin and C1 protease inhibitor in human bile, plasma and spleen. *FEBS Lett.* **299**, 146–148
10. Dichtl, W., Moraga, F., Ares, M. P., Crisby, M., Nilsson, J., Lindgren, S., and Janciauskiene, S. (2000) The carboxyl-terminal fragment of alpha1-antitrypsin is present in atherosclerotic plaques and regulates inflammatory transcription factors in primary human monocytes. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* **4**, 50–61

11. Machii, R., Sakatume, M., Kubota, R., Kobayashi, S., Gejyo, F., and Shiba, K. (2005) Examination of the molecular diversity of alpha1 antitrypsin in urine: deficit of an alpha1 globulin fraction on cellulose acetate membrane electrophoresis. *J. Clin. Lab. Anal.* **19**, 16–21
12. Zhou, J., Trock, B., Tsangaris, T. N., Friedman, N. B., Shapiro, D., Brotzman, M., Chan-Li, Y., Chan, D. W., and Li, J. (2010) A unique proteolytic fragment of alpha1-antitrypsin is elevated in ductal fluid of breast cancer patient. *Breast Cancer Res. Treat.* **123**, 73–86
13. Blaurock, N., Schmerler, D., Hünninger, K., Kurzai, O., Ludewig, K., Baier, M., Brunkhorst, F. M., Imhof, D., and Kiehntopf, M. (2016) C-Terminal Alpha-1 Antitrypsin Peptide: A New Sepsis Biomarker with Immunomodulatory Function. *Mediators Inflamm.* **2016**, 6129437
14. Blaurock-Möller, N., Gröger, M., Siwczak, F., Dinger, J., Schmerler, D., Mosig, A. S., and Kiehntopf, M. (2019) CAAP48, a New Sepsis Biomarker, Induces Hepatic Dysfunction in an in vitro Liver-on-Chip Model. *Front. Immunol.* **10**, 273
15. Cercek, L., and Cercek, B. (1992) Cancer-associated SCM-recognition, immunodefense suppression, and serine protease protection peptide. Part I. Isolation, amino acid sequence, homology, and origin. *Cancer Detection and Prevention.* **16**, 305–319
16. Niemann, M. A., Baggott, J. E., and Miller, E. J. (1997) Binding of SPAAT, the 44-residue C-terminal peptide of alpha 1-antitrypsin, to proteins of the extracellular matrix. *J. Cell. Biochem.* **66**, 346–357
17. Münch, J., Ständker, L., Adermann, K., *et al.* (2007) Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 Fusion Peptide. *Cell* **129**, 263–275
18. Oda, Y., Takahashi, C., Harada, S., Nakamura, S., Sun, D., Kiso, K., Urata, Y., Miyachi, H., Fujiyoshi, Y., Honigmann, A., Uchida, S., Ishihama, Y., and Toyoshima, F. (2021) Discovery of anti-inflammatory physiological peptides that promote tissue repair by reinforcing epithelial barrier formation. *Sci. Adv.* **7**, eabj6895
19. Sobel, K., Monnier, L., Menyhart, K., Bolinger, M., Studer, R., Nayler, O., and Gatfield, J. (2015) FTY720 Phosphate Activates Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 and Selectively Couples to Gα12/13/Rho/ROCK to Induce Myofibroblast Contraction. *Mol. Pharmacol.* **87**, 916–927

20. Marinissen, M. J., Servitja, J. M., Offermanns, S., Simon, M. I., and Gutkind, J. S. (2003) Thrombin protease-activated receptor-1 signals through Gq- and G13-initiated MAPK cascades regulating c-Jun expression to induce cell transformation. *J. Biol. Chem.* **278**, 46814–46825
21. Gohla, A., Offermanns, S., Wilkie, T. M., and Schultz, G. (1999) Differential involvement of G α 12 and G α 13 in receptor-mediated stress fiber formation. *J. Biol. Chem.* **274**, 17901–17907
22. Gilman, A. G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615–649
23. Morris, A. J., and Malbon, C. C. (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol. Rev.* **79**, 1373–1430
24. Duc, N. M., Kim, H. R., and Chung, K. Y. (2015) Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **763(Pt B)**, 214–222
25. Yang, Y. M., Kuen, D. S., Chung, Y., Kurose, H., and Kim, S. G. (2020) G α 12/13 signaling in metabolic diseases. *Exp. Mol. Med.* **52**, 896–910
26. Wu, D., and Casey, P. J. (2024) GPCR-G α 13 Involvement in Mitochondrial Function, Oxidative Stress, and Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 7162
27. Shibasaki, Y., and Yazaki, Y. (1997) Massive actin polymerization induced by phosphatidylinositol-4-phosphate5-kinase in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**, 7578-7581
28. Malcolm, K.C., and Exton J.H. (1994) Activation of rat liver phospholipase D by the small GTP-binding protein RhoA. *J. Biol. Chem.* **269**, 25951-25954
29. Kuribara, H., and Kanaho, Y. (1995) Synergistic activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factor and rhoA p21, and its inhibition by Clostridium botulinum C3 exoenzyme. *J. Biol. Chem.* **270**, 25667-25671
30. Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., and Huang, X. Y. (2016) Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J. Mol. Biol.* **428**, 3850–3868

31. Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N., and Johnson, G. L. (1995) $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J. Biol. Chem.* **270**, 24631–24634
32. Hart, M. J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W. D., Gilman, A. G., Sternweis, P. C., and Bollag, G. (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by $G\alpha_{13}$. *Science* **280**, 2112–2114
33. Gohla, A., Harhammer, R., and Schultz, G. (1998) The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J. Biol. Chem.* **273**, 4653–4659
34. Fukuhara, S., Murga, C., Zohar, M., Igishi, T., and Gutkind, J. S. (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J. Biol. Chem.* **274**, 5868–5879
35. Mosaddeghzadeh, N., and Ahmadian, M. R. (2021) The RHO Family GTPases: Mechanisms of Regulation and Signaling. *Cells* **10**, 1831
36. Siderovski, D. P., and Willard, F. S. (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int. J. Biol. Sci.* **1**, 51–66
37. Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M. J., Sternweis, P. M., Singer, W. D., Gilman, A. G., Bollag, G., and Sternweis, P. C. (1998) p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$. *Science* **280**, 2109–2111
38. Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H., and Kozasa, T. (2003) $G\alpha_{12}$ activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 733–738
39. Wells, C. D., Liu, M. Y., Jackson, M., Gutowski, S., Sternweis, P. M., Rothstein, J. D., Kozasa, T., and Sternweis, P. C. (2002) Mechanisms for reversible regulation between G13 and Rho exchange factors. *J. Biol. Chem.* **277**, 1174–1181
40. Garcia-Marcos, M. (2024) Heterotrimeric G protein signaling without GPCRs: The $G\alpha$ -binding-and-activating (GBA) motif. *J. Biol. Chem.* **300**, 105756-105756

41. Garcia-Marcos, M., Ghosh, P., and Farquhar, M. G. (2009) GIV is a nonreceptor GEF for G α i with a unique motif that regulates Akt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 3178–3183
42. Gupta, V., Bhandari, D., Leyme, A., Aznar, N., Midde, K. K., Lo, I. C., Ear, J., Niesman, I., López-Sánchez, I., Blanco-Canosa, J. B., von Zastrow, M., Garcia-Marcos, M., Farquhar, M. G., and Ghosh, P. (2016) GIV/Girdin activates G α i and inhibits G α s via the same motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, E5721–5730
43. Kreutz, B., Yau, D. M., Nance, M. R., Tanabe, S., Tesmer, J. J., and Kozasa, T. (2006) A new approach to producing functional G α subunits yields the activated and deactivated structures of G α (12/13) proteins. *Biochemistry* **45**, 167–174
44. Tsai, C. F., Zhang, P., Scholten, D., Martin, K., Wang, Y. T., Zhao, R., Chrisler, W. B., Patel, D. B., Dou, M., Jia, Y., Reduzzi, C., Liu, X., Moore, R. J., Burnum-Johnson, K. E., Lin, M. H., Hsu, C. C., Jacobs, J. M., Kagan, J., Srivastava, S., Rodland, K. D., Steven Wiley, H., Qian, W. J., Smith, R. D., Zhu, Y., Cristofanilli, M., Liu, T., Liu, H., and Shi, T. (2021) Surfactant-assisted one-pot sample preparation for label-free single-cell proteomics. *Commun. Biol.* **4**, 265
45. Battellino, T., Ogata, K., Spicer, V., Ishihama, Y., and Krokhin, O. (2023) Acetic Acid Ion Pairing Additive for Reversed-Phase HPLC Improves Detection Sensitivity in Bottom-up Proteomics Compared to Formic Acid. *J. Proteome. Res.* **22**, 272–278
46. MacLean, B., Tomazela, D. M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G. L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D. L., Liebler, D. C., and MacCoss, M. J. (2010) Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* **26**, 966–968
47. Okuda, S., Watanabe, Y., Moriya, Y., Kawano, S., Yamamoto, T., Matsumoto, M., Takami, T., Kobayashi, D., Araki, N., Yoshizawa, A. C., Tabata, T., Sugiyama, N., Goto, S., and Ishihama, Y. (2017) jPOSTrepo: an international standard data repository for proteomes. *Nucleic. Acids. Res.* **45**(D1), D1107–D1111
48. Mastop, M., Reinhard, N. R., Zuconelli, C. R., Terwey, F., Gadella, T. W. J. Jr., van Unen, J., Adjobo-Hermans, M. J. W., and Goedhart, J. (2018) A FRET-based biosensor for measuring G α 13 activation in single cells. *PLoS One* **13**, e0193705
49. Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A. M. (2003) HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1731–1737

50. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54(Pt 5)**, 905–921
51. Mark, J. A., Teemu, M., Roland, S., Szilárd, P., Jeremy, C. S., Berk, H., and Erik, L. (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1**, 19–25.
52. Schmidt, M. W., Baldrige, K. K., Boatz, J. A., Elbert, S. T., Gordon, M. S., Jensen, J. H., Koseki, S., Matsunaga, N., Nguyen, K. A., Su, S. J., Windus, T. L., Dupuis, M., and Montgomery, J. A. (1993) General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comput. Chem.* **14**, 1347–1363
53. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W., and Kollman, P. A. (1993) A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* **97**, 10269–10280
54. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., and Case, D. A. (2004) Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **25**, 1157–1174
55. Sousa da Silva, A. W., and Vranken, W. F. (2012) ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. *BMC Res. Notes* **5**, 367
56. Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., and Shaw, D. E. (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* **78**, 1950–1958
57. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935
58. Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993) Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089–10092

59. Hess, B. (2008) P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 116–122
60. Bussi, G., Donadio, D., and Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **126**, 014101
61. Parrinello, M., and Rahman, A. (1981) Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **52**, 7182–7190
62. Mondal, S., Hsiao, K., and Goueli, S. A. (2015) A Homogenous Bioluminescent System for Measuring GTPase, GTPase Activating Protein, and Guanine Nucleotide Exchange Factor Activities. *Assay Drug Dev. Technol.* **13**, 444–455
63. Tschirpke, S., Daalman, W. K., and Laan, L. (2024) Quantification of GTPase Cycling Rates of GTPases and GTPase:Effector Mixtures Using GTPase Glo Assays. *Curr. Protoc.* **4**, e1000
64. Chen, Z., Singer, W. D., Wells, C. D., Sprang, S. R., and Sternweis, P. C. (2003) Mapping the Galpha13 binding interface of the rgRGS domain of p115RhoGEF. *J. Biol. Chem.* **278**, 9912–9919
65. Nakamura, S., Kreutz, B., Tanabe, S., Suzuki, N., and Kozasa, T. (2004) Critical role of lysine 204 in switch I region of Gα13 for regulation of p115RhoGEF and leukemia-associated RhoGEF. *Mol. Pharmacol.* **66**, 1029–1034
66. Sternweis, P. C., and Gilman, A. G. (1982) Aluminum: a requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 4888–4891
67. Manzi, L., Barrow, A.S., Scott, D., Layfield, R., Wright, T.G., Moses, J.E., Oldham, N.J. (2016) Carbene footprinting accurately maps binding sites in protein-ligand and protein-protein interactions. *Nat. Commun.* **7**, 13288.
68. Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A. M. (2003) HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1731–1737
69. Meyer, B. H., Freuler, F., Guerini, D., and Siehler, S. (2008) Reversible translocation of p115-RhoGEF by G(12/13)-coupled receptors. *J. Cell. Biochem.* **104**, 1660–1670

70. Kalogriopoulos, N. A., Rees, S. D., Ngo, T., Kopcho, N. J., Ilatovskiy, A. V., Sun, N., Komives, E. A., Chang, G., Ghosh, P., and Kufareva, I. (2019) Structural basis for GPCR-independent activation of heterotrimeric Gi proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 16394–16403
71. Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Dror, R.O., Shaw, D.E. (2011) How fast-folding proteins fold. *Science* **334**, 517-520

謝辞

本研究を行うにあたり、石橋理基助教、豊島文子教授には細胞の取り扱いや様々な実験の手技のみならず、研究に対する姿勢についてまで幅広いご指導を賜りましたこと心より感謝申し上げます。

松本篤幸准教授（京都大学大学院医学研究科）、小形公亮助教(京都大学大学院薬学研究科)、有地法人助教(京都大学大学院薬学研究科)、小笹徹教授(横浜薬科大学薬学研究科)、奥野恭史教授（京都大学大学院医学研究科）、大野浩章教授(京都大学大学院薬学研究科)、石濱泰教授(京都大学大学院薬学研究科)には、共同研究のみならず、研究を進める上で多くの助言を賜りましたこと感謝申し上げます。理化学研究所（RIKEN）計算科学研究センターのBiao Ma研究員・金田亮研究員・井阪悠太研究員には、ドッキングシミュレーション及びMDシミュレーション解析をご支援賜りましたこと深く感謝申し上げます。

最後に、京都大学大学院生命科学研究科細胞増殖統御学分野の皆様、特に牧律子技術補佐員、修士1年のXiaowen Liangさんには、実験補助をはじめ様々なサポートやアドバイスをいただきました。御礼申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yonghak Park, Shigeyuki Matsumoto, Kosuke Ogata, Biao Ma, Ryo Kanada, Yuta Isaka, Norihito Arichi, Xiaowen Liang, Ritsuko Maki, Tohru Kozasa, Yasushi Okuno, Hiroaki Ohno, Yasushi Ishihama and Fumiko Toyoshima
Receptor-independent regulation of $\alpha 13$ by alpha-1-antitrypsin C-terminal peptides
Journal of Biological Chemistry in press 2024
DOI: 10.1016/j.jbc.2024.108136

2025年1月7日

朴 龍鶴