

Mini Review

グアニンヌクレオチド交換タンパク質(guanine nucleotide-exchange protein; GEP)によるマクロファージ様細胞のアポトーシス誘導

染谷明正¹⁾, Moss Joel²⁾, Vaughan Martha²⁾, 長岡 功¹⁾

¹⁾順天堂大学医学部生化学・生体防御学

²⁾PCCMB, NHLBI, NIH, USA

ARF-GEP₁₀₀, a guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor 6, involved in the apoptotic cell death of phagocytes

ADP-ribosylation factors (ARFs) are 20-kDa GTP-binding proteins involved in the vesicular trafficking, the activation of phospholipase D and phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, and the modulation of phagocyte functions. Like other GTP-binding proteins, ARFs cycle between GTP-bound, active and GDP-bound, inactive status. Guanine nucleotide-exchange proteins (GEPs), which catalyze the change of bound GDP for GTP, are necessary for the activation of ARFs. Previously, we found a novel GEP with 100kDa, named ARF-GEP₁₀₀. In this study, we elucidated the role in ARF-GEP₁₀₀ on phagocyte functions by transfection of ARF-GEP₁₀₀.

Overexpression of ARF-GEP₁₀₀ induced apoptosis of mouse macrophage RAW264.7 cells and phorbol 12-myristate 13-acetate treated human monocyte U937 cells, which could be detected by morphological changes (nuclear condensation and formation of apoptotic bodies), annexin V-staining and TUNEL assay. ARF-GEP₁₀₀-induced apoptosis was not inhibited by a caspase inhibitor zVAD-FMK. Furthermore, mutant analysis of ARF-GEP₁₀₀ revealed that two regions (N- and C- termini) of ARF-GEP₁₀₀ were essential for the induction of apoptosis, but the mutant defective in GDP-GTP exchange domain induced apoptosis. These results suggest that ARF-GEP₁₀₀ induces apoptosis of monocytic phagocytes independent of both the caspase activation and GDP-GTP exchange activity.

Rec.7/22/2005, Acc.9/15/2005, pp107-112

Akimasa Someya¹⁾, Joel Moss²⁾, Martha Vaughan²⁾ and Isao Nagaoka¹⁾

¹⁾Department of Host Defence and Biochemical Research, Juntendo University, School of Medicine

²⁾Pulmonary-Critical Care Medicine Branch, NHLBI, NIH, USA

Key words guanine nucleotide-exchange protein, ARF-GEP, apoptosis, phagocyte

はじめに

細胞内には数多くのシグナル分子が存在しており、その中で低分子量Gタンパク質 (small GTP-binding protein) と呼ばれる一群の分子は、細胞運動やタンパク輸送をはじめとする多くの細胞機能に関わるシグナル分子として重要な役割を担っている。Gタンパク質はGTPと結合し、そ

れ自身が持つGTPase活性によってGTPをGDPに分解するタンパク質の総称であり、分子量20-40kDaのものを特に低分子量Gタンパク質と呼ぶ¹⁾。

低分子量Gタンパク質の活性はGTP結合型(活性型)とGDP結合型(不活性型)の交換反応により調節されている¹⁾。そして、それぞれの反応にGDP結合型をGTP結

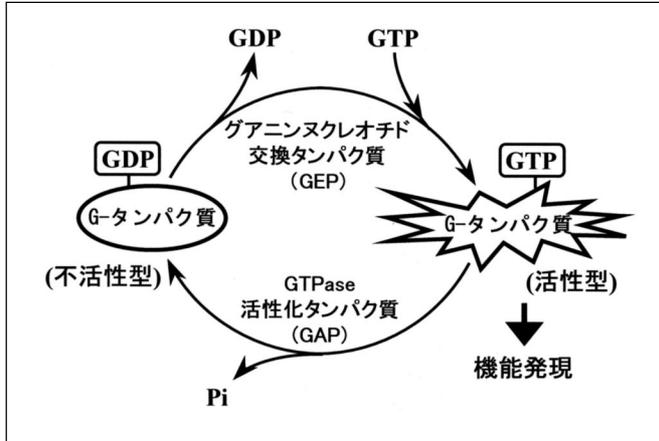


図1 低分子量Gタンパク質の活性調節機構
GEPおよびGAPによる活性化・不活性化

合型に変換するグアニンヌクレオチド交換タンパク質 (guanine nucleotide exchange protein; GEP)と、GTPase 活性を上昇させ、GTPのGDPへの加水分解を促進するGTPase 活性化タンパク質(GTPase-activating protein; GAP)が関与している(図1)。

低分子量Gタンパク質は、構造的に分類するとRas, Rho, Rab, ARF/Sar, Ranの5つのファミリーに分類される。各ファミリーの役割は多岐にわたるが、大別するとRasファミリーは遺伝子発現の調節と細胞の増殖や分化、Rhoファミリーは細胞骨格系を中心とした細胞形態の調節、RabファミリーとARF/Sarファミリーは細胞内のタンパク輸送、Ranファミリーは核-細胞質間の輸送にそれぞれ関与している¹⁾。

筆者らはARFをGTP結合型に変換するタンパク質、ARF-GEP₁₀₀を発見し²⁾、その生理的役割や作用機序について研究を進めてきた。本稿では、ARFおよびその活性を調節するタンパク質について概説するとともにARF-GEP₁₀₀の働きについて、最近得られた知見を紹介する。

ARF

ARFとは、ADPリボシル化因子(ADP-ribosylation factor)の略名であり、コレラトキシンAサブユニットのADPリボシルトランスフェラーゼ活性を上昇させるタンパクとして1984年にウサギの肝臓から単離された³⁾。ARFはすべての真核細胞に存在し、哺乳動物ではARF1からARF6の6種類が同定されている。これらARFは分子量、相同性、遺伝子構造、系統的解析などからクラスI(ARF1, ARF2, ARF3)、クラスII(ARF4, ARF5)、クラスIII(ARF6)に分類され、それぞれ181, 180, 175アミノ酸残基からなる。すべてのARFは、N末端側のグリシン残基がミリスチル化されており、これが膜との結合に関与している。

ARFの役割として、細胞内の小胞輸送、ホスホリパーゼDやホスファチジルイノシトール5-キナーゼの活性化などが知られている^{4,5)}。特にARF1の小胞輸送における役割が詳細に研究され、ARF1が小胞体-ゴルジ間や、シスゴルジ網-トランスゴルジ網の間、およびゴルジ-エンドソーム間の輸送小胞の形成に必要であることが明らかとなっている。一方、ARF6は同じ小胞輸送でも細胞膜-エンドソーム間の輸送に関与している。これらの詳細なメカニズムは他稿⁶⁻⁸⁾を参照されたい。これら機能に加え、近年、ARF6の新たな機能として、白血球機能(運動能⁹⁾、食作用¹⁰⁾、活性酸素産生¹¹⁾の調節や、細胞間接着の調節¹²⁾、および癌細胞浸潤に必要な突起形成¹³⁾に関与することが報告されている。

ARF特異的GEPとGAP

前述したように低分子量Gタンパク質の活性はGEPとGAPによって調節されるが、これまでに、ARFに特異的なGEPとGAPが複数報告されている。なお、GEPはguanine nucleotide exchange factor(GEF)とも呼ばれるが、本稿ではGEPの略称を用いる。

ARF特異的GEPとして最初に同定されたのは、47kDaのARNO(ARF nucleotide-binding site opener, cytohesin 2とも呼ぶ)である¹⁴⁾(図2A)。従来、プレフェルジンA(BFA)はゴルジに存在するARFに特異的なGEPであるARF-GEPに作用し、GEP活性を阻害することで小胞輸送を抑制すると考えられていた。しかし、ARNOのGEP活性はBFAで阻害されないことから、他にBFAに感受性のあるARF-GEPが存在すると考えられるようになった。そして、200kDaのBFA感受性ARF-GEPが発見され¹⁵⁾、Brefeldin A-inhibited GEP 1(BIG 1)と呼ばれるようになった¹⁶⁾。

これまでに報告されている哺乳類のARF-GEPは、47-

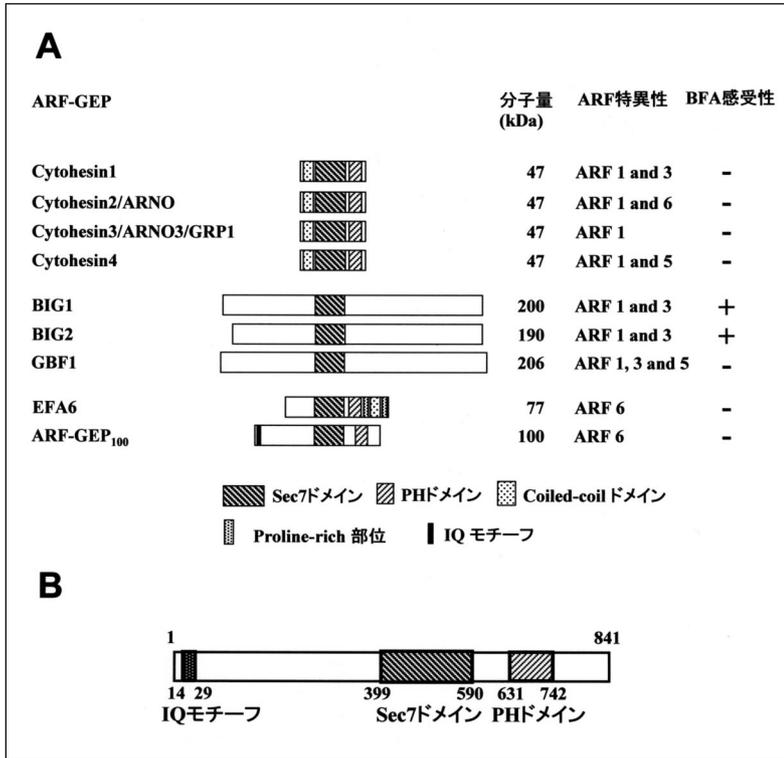


図2 哺乳動物の ARF-GEP
 (A)これまでに報告されている ARF-GEPの模式図。(B)ARF-GEP₁₀₀の模式図。Sec7ドメイン; ARF 結合部位, GDP/GTP 交換反応触媒部位。PHドメイン;ホスファチジルイノシトール結合部位。Coiled-coil ドメイン; Coiled-coilドメイン同士の結合による複合体形成。Proline-rich 部位; SH3ドメイン (Srcホモロジードメイン)との結合部位。IQモチーフ;カルモジュリンとの結合部位。

203kDa と分子の大きさに幅があるが、共通してSec7ドメイン(約200アミノ酸残基)を持つ(図2A)。Sec7ドメインは、酵母Sec7タンパクとホモロジーを持つことから名付けられ、ARFとの結合とGDP/GTP交換反応を触媒する部位を含むことから、GEP活性に最も重要な部分である。また、Sec7ドメインはBIG1のBFA感受性を決定するアミノ酸配列も含む。ARF-GEPを構造的に分類すると、47kDa(cytohesinファミリー)の低分子量型、約200kDaの高分子量型、およびその中間型(77と100kDa)に分類される(図2A)。ARF-GEPがどのARFに作用するかは様々であるが、多くはARF1に強く働く。しかし、中間型のEFA6とARF-GEP₁₀₀はARF6に働く^{2,6-8)}。

一方、ARFに特異的なGAP(ARF-GAP)として、ARF1をターゲットとするARF1-GAPがラット肝臓から最初に単離された¹⁷⁾。これまでに分子量42-130kDaのARF-GAPが同定されているが、これらはすべて、約120アミノ酸残基からなるARF-GAPドメインを持ち、ここに存在するzinc fingerモチーフがGAP活性に必要なことがわかっている^{7,18,19)}。

ARF-GEP₁₀₀の発見

筆者らは、新規ARF-GEPを探するためcytohesin 1のSec7ドメインのcDNA配列をもとにホモロジー検索を行った。

そして、841アミノ酸をコードするARF-GEP₁₀₀(ARF-GEP of 100kDa)を発見した²⁾(図2B)。ARF-GEP₁₀₀は前述したようにARF6に働き、BFA非感受性である²⁾。そしてその構造は、N末端側にIQモチーフ〔イソロイシン(I)とグルタミン(Q)が並んで存在することから名付けられた〕、C末端側にPHドメイン(pleckstrin homology domain, pleckstrinタンパクと相同性があることから名付けられた)、中心部にSec7ドメインを持つ。IQモチーフはカルモジュリン結合部位と推測されており、このモチーフを持つARF-GEPはARF-GEP₁₀₀だけである。また、PHドメインはイノシトールリン脂質との結合部位として知られており、他のARF-GEPにも存在する(図2A)。さらに種々の組織におけるARF-GEP₁₀₀のmRNA発現を調べたところ白血球に多く発現していることがわかった²⁾。そこで、白血球機能におけるARF-GEP₁₀₀の役割について検討した。

白血球におけるARF-GEP₁₀₀の役割

白血球の中でも特にマクロファージに注目し、マウスマクロファージ系細胞株RAW264.7およびマクロファージ様に分化させたヒト単球系細胞株U937にgreen fluorescent protein(GFP)遺伝子を付加したARF-GEP₁₀₀(GFP-ARF-GEP₁₀₀)をトランスフェクションして、どのような変化が起こるか検討した。図3に示すように、GFP-ARF-GEP₁₀₀

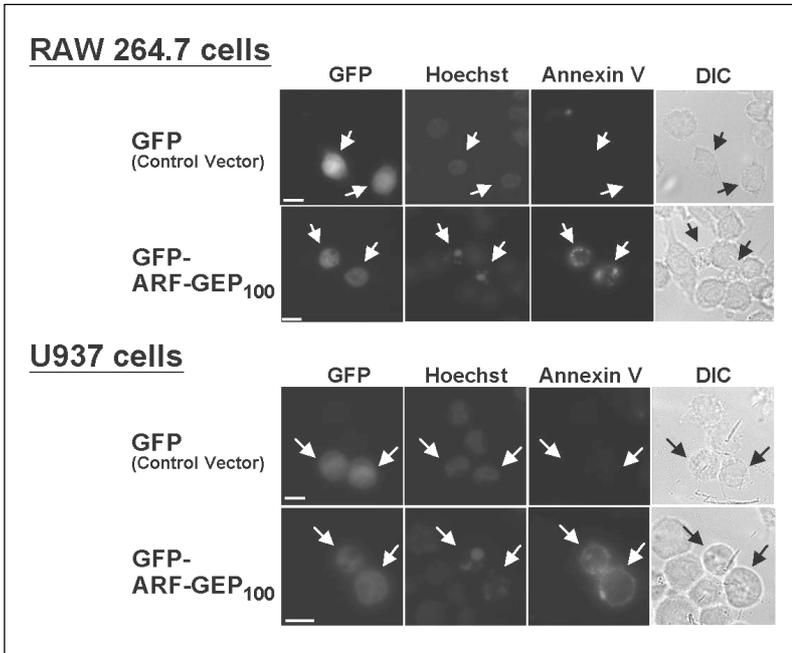


図3 ARF-GEP₁₀₀を発現させた細胞の形態変化

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 (RAW264.7 cells)またはホルボールエステル処理でマクロファージ様に分化させたヒト単球系細胞株 U937(U937 cells)に GFP 単独 (GFP) ,または GFP を付加させた ARF-GEP₁₀₀ (GFP-ARF-GEP₁₀₀) を発現させた .そして細胞をヘキスト 33342 (クロマチンと結合) と アネキシン V (アポトーシスを起こすと細胞膜表面に露出するホスファチジルセリンと結合) で染色した .DIC ; 微分干渉イメージ . 矢印で示した細胞は GFP または GFP-ARF-GEP₁₀₀ が発現された細胞 .

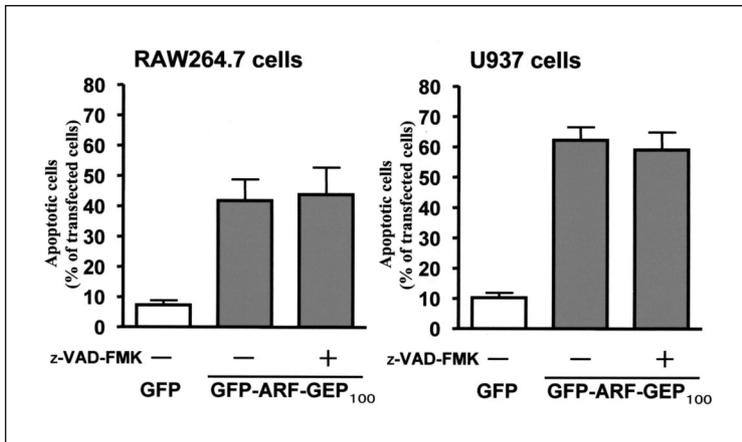


図4 GFP-ARF-GEP₁₀₀の発現で誘導されるアポトーシスに対するカスパーゼ阻害剤の影響

RAW264.7 細胞(RAW264.7 cells) , およびホルボールエステル処理した U937 細胞(U937 cells)に , GFP 単独(GFP) , または GFP-ARF-GEP₁₀₀(GFP-ARF-GEP₁₀₀) を発現させた . GFP-ARF-GEP₁₀₀ の発現は , zVAD-FMK (カスパーゼ阻害剤) 存在下または非存在下で行われた . トランスフェクションされた細胞のうち , アポトーシスを起こした細胞を % で示した .

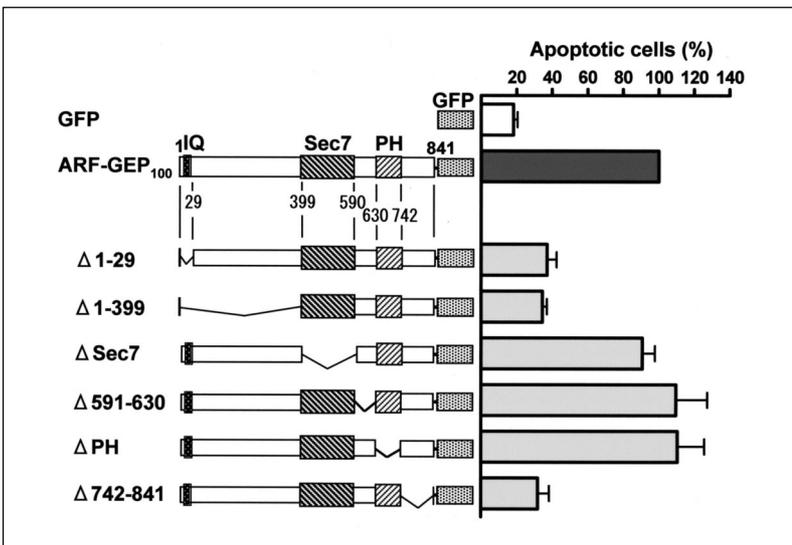


図5 ARF-GEP₁₀₀欠失変異体のアポトーシス誘導能

RAW264.3 細胞に GFP-ARF-GEP₁₀₀ 欠失変異体(模式図で示した) を発現させ , アポトーシス誘導能を調べた . 野生型 ARF-GEP₁₀₀ を発現させた時のアポトーシス細胞を 100% としたときの相対活性で示した .

を細胞に発現させると、核の断片化や濃縮、アネキシンVの細胞膜への結合、細胞の円形化など、アポトーシス様の形態変化を起こした。一方、GFPのみを発現させてもこのような変化は起こらなかった。この結果を定量するとGFP-ARF-GEP₁₀₀を発現させた細胞の40～60%がアポトーシスを起こしたが、GFPのみを発現させた細胞はアポトーシスをほとんど起さなかった(図4)。この時のGFP-ARF-GEP₁₀₀の発現量を、抗ARF-GEP₁₀₀抗体を用いて調べたところ、内在性ARF-GEP₁₀₀量の60～75%に相当する量が発現されていることがわかった(data not shown)。したがって、生理的なARF-GEP₁₀₀の発現量でもアポトーシスが誘導されることが推測される。

次に、ARF-GEP₁₀₀のアポトーシス誘導メカニズムを検討するため、カスパーゼ阻害剤による影響を調べた。その結果、GFP-ARF-GEP₁₀₀を発現することで誘導されるアポトーシスは、カスパーゼ阻害剤zVAD-FMKで阻害されなかった(図4)。したがってARF-GEP₁₀₀によるアポトーシス誘導には、カスパーゼが関与しないことが推測された。

さらにARF-GEP₁₀₀の構造で、どの部分がアポトーシス誘導に関与しているかを、欠失変異体を用いて検討した(図5)。その結果、ARFの活性化に必要なSec7ドメインを欠失させても活性は残っていた。一方、GFP-ARF-GEP₁₀₀のN末端側またはC末端側を欠失させるとアポトーシス誘導活性が低下した。さらに、N末端とC末端側部分を連結させたARF-GEP₁₀₀断片を発現させるとアポトーシスが誘導された(data not shown)。これらのことから、ARF-GEP₁₀₀によるアポトーシス誘導には、ARFの活性化は関与しておらず、ARF-GEP₁₀₀分子のN末端とC末端側部分が重要な働きをしていると推測された。N末端部分にはカルモジュリン結合部位と考えられているIQモチーフが存在する。しかし、カルモジュリンピーズを用いた結合実験ではARF-GEP₁₀₀とカルモジュリンとの結合が認められなかった(data not shown)。また、これまでに発見されたIQモチーフを含むタンパク質の中で、実際にカルモジュリンと高い結合能を持つものは少なく²⁰⁾、ARF-GEP₁₀₀のアポトーシス誘導にカルモジュリンが関与しているかどうか不明である。一方、C末端側には、既存の機能配列が認められず、アポトーシス誘導におけるN末端とC末端側部分の役割を今後検討しなくてはならない。

おわりに

我々が発見したARF-GEP₁₀₀の白血球、特にマクロファージにおける役割を調べた。その結果、ARF-GEP₁₀₀がアポトーシス誘導に関与する可能性があることを見出した。また、阻害剤を用いた実験から、このアポトーシス誘導はカスパーゼ非依存的に起きていることが推測された。これまで、カス

パーゼ非依存的なアポトーシス誘導に関与する分子として、AIF(apoptosis-inducing factor)やendonuclease Gが報告されている²¹⁾。これらは、刺激に応じてミトコンドリアから細胞質に放出され、両者が結合することで相乗的に核のDNAを断片化すると報告されている²¹⁾。しかし、その詳細はわかっていない。ARF-GEP₁₀₀とAIFやendonuclease Gとの関わり合いを調べることは、双方の作用メカニズムを知る上で有用な知見が得られると考えられる。

ARF-GEP₁₀₀はARF6を活性化するタンパクとして同定されたが、本実験でアポトーシス誘導にも関与することが推測された。したがって、この分子はARF6の活性化が関与する種々の機能を調節するとともに、アポトーシス誘導にも寄与することで、白血球機能を多面的に調節しているのではないかと期待している。今後、ARF-GEP₁₀₀のアポトーシス誘導活性とGEP活性がそれぞれどのように調節されているか、その制御機構を解明するため、ARF-GEP₁₀₀と相互作用する分子の同定とその役割を明らかにしたいと考えている。

文 献

- 1) Takai Y, Sasaki T, Matozaki T: Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 81: 153-208, 2001.
- 2) Someya A, Sata M, Takeda K, Pacheco-Rodriguez G, Ferrans VJ, Moss J, Vaughan M: Proc Natl Acad Sci USA, 98: 2413-2418, 2001.
- 3) Kahn RA, Gilman AG: Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. *J Biol Chem*, 259: 6228-6234, 1984.
- 4) Moss J, Vaughan M: Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J Biol Chem*, 270: 12327-12330, 1995.
- 5) Moss J, Vaughan M: Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem*, 273: 21431-21434, 1998.
- 6) Chavrier P, Goud B: The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 466-475, 1999.
- 7) Nie Z, Hirsch DS, Randazzo PA: Arf and its many interactors. *Curr Opin Cell Biol*, 15: 396-404, 2003.
- 8) Donaldson JG: Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 278: 41573-41576, 2003.
- 9) Criss AK, Silva M, Casanova JE, McCormick BA: Regulation of Salmonella-induced neutrophil transmigration by epithelial ADP-ribosylation factor 6. *J Biol Chem*, 276:

- 48431-48439, 2001.
- 10) Zhang Q, Cox D, Tseng CC, Donaldson JG, Greenberg S: A requirement for ARF6 in Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem*, 273: 19977-19981, 1998
 - 11) Dana RR, Eigsti C, Holmes KL, Leto TL: A regulatory role for ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) in activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 275: 32566-32571, 2000.
 - 12) Palacios F, Price L, Schweitzer J, Collard JG, D'Souza-Schorey C: An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *EMBO J*, 20: 4973-4986, 2001.
 - 13) Hashimoto S, Onodera Y, Hashimoto A, Tanaka M, Hamaguchi M, Yamada A., Sabe H: Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 6647-6652, 2004.
 - 14) Chardin P, Paris S, Antony B, Robineau S, Beraud-Dufour S, Jackson CL, Chabre M: A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*, 384: 481-484, 1996.
 - 15) Morinaga N, Tsai, S C, Moss J, Vaughan M: Isolation of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP ribosylation factor (ARF) 1 and ARF3 that contains a Sec7-like domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 12856-12860, 1996.
 - 16) Togawa A, Morinaga N, Ogasawara M, Moss J, Vaughan M: Purification and cloning of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem*, 274: 12308-12311, 1999.
 - 17) Makler V, Cukierman E, Rotman M, Admon A, Cassel D: ADP-ribosylation factor-directed GTPase-activating protein. Purification and partial characterization. *J Biol Chem*, 270: 5232-5237, 1995.
 - 18) Donaldson JD, Jackson CL: Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, 12: 475-482, 2000.
 - 19) Donaldson JD: Filling in the GAPs in the ADP-ribosylation factor story. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 3792-3794, 2000.
 - 20) Rhoads AR, Friedberg F: Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J*, 11, 331-340, 1997.
 - 21) Jaattela M, Tschopp J: Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol*, 4: 416-423, 2003.