

Ric-8B のユビキチン-プロテアソーム系に依存した
G 蛋白質シグナル調節機構の解析

永井 裕介

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞内情報学講座

(伊東 広 教授)

平成 22 年 1 月 25 日提出

目次

序論		3
材料と目的		8
結果		16
考察		38
謝辞		44
参考文献		45

序論

ヘテロ三量体グアニンヌクレオチド結合蛋白質（G 蛋白質）は、 α サブユニット（ $G\alpha$ ）と $\beta\gamma$ サブユニット複合体（ $G\beta\gamma$ ）から構成されており、細胞表層に存在する G 蛋白質共役型受容体（G protein-coupled receptor: GPCR）を介した細胞外からのシグナルを細胞内へと伝達するグアニンヌクレオチド依存性の分子スイッチとして機能する。ホルモンや光、匂い物質などの細胞外のシグナルはそれぞれ特異的な GPCR によって受容され、活性化した GPCR は $G\alpha\beta\gamma$ と相互作用することによって $G\alpha$ における GDP/GTP 交換反応を触媒する。この交換反応により、G 蛋白質と受容体の相互作用が弱まると同時に $G\alpha$ -GTP は $G\beta\gamma$ から解離する。これらの $G\alpha$ -GTP と $G\beta\gamma$ はそれぞれ独立あるいは協調的に下流標的分子（エフェクター蛋白質）を活性化し、さらに下流へとシグナルを伝達する。 $G\alpha$ は内在的に GTP 加水分解（GTPase）活性を持っており、 $G\alpha$ に結合していた GTP を GDP とリン酸へ加水分解する。結果として、 $G\alpha$ -GDP は再び $G\beta\gamma$ と結合し、G 蛋白質シグナルは終結する（図 1）。このような G 蛋白質の GTPase サイクルにおいて、リガンドによって活性化された GPCR はグアニンヌクレオチド交換因子（guanine nucleotide exchange factor: GEF）として、 $G\beta\gamma$ は $G\alpha$ から GDP の解離を抑制するグアニンヌクレオチド解離阻害因子（guanine nucleotide dissociation inhibitor: GDI）として機能している（Gilman, 1987; Kaziro et al., 1991）。

G 蛋白質の多様性は主として $G\alpha$ の多様性に由来しており、 $G\alpha$ の構造及び機能から G_s 、 G_i 、 G_q 及び G_{12} の 4 種のサブファミリーに分類されている。これらの $G\alpha$ はそれぞれ異なるエフェクター蛋白質の活性を調節する。 G_s はアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる。一方、 G_i はアデニル酸シクラーゼに対して抑制的に働くことによって cAMP シグナルに対して拮抗作用を示す。 G_q はホスホリパーゼ $C\beta$ を活性化することによってその基質であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸を分解し、セカンドメッセンジャーであるイノシトール 1,4,5-三リン酸とジアシルグリセロール（DAG）を産生する。 G_{12} は p115RhoGEF 等の Rho ファミリー低分子量 GTPase に対する GEF の活性を制御することにより Rho の活性を調節し、アクチン骨格系のリモデリングを誘導する。このように、 $G\alpha$ は特異的なエフェクターとの組み合わせにより特徴的なシグナル経路を構築している。

このような $G\alpha$ の性質に加えて、 $G\alpha$ は翻訳後修飾を受けることにより、その蛋白質としての挙動が調節されている（Chen and Manning, 2001）。特に脂質修飾は効率的に G 蛋白質シグナルを伝達するために必須であることからよく研究されている。ほとんどの $G\alpha$ は N 末端のグリシン残基がミリストイル

化または N 末端近傍のシステイン残基がパルミトイル化されており、この脂質修飾は $G\alpha$ の細胞膜への局在に必須なほか(Huang et al., 1999; Wedegaertner et al., 1993)、 $G\beta\gamma$ との相互作用にも影響を与えている(Iiri et al., 1996)。また、この脂質修飾は細胞外からのシグナルによって調節されていることが示唆されており、例えば $G\alpha_s$ のパルミトイル化サイクルは GPCR リガンドによる刺激によって促進されることが報告されている(Mumby, 1997; Wedegaertner and Bourne, 1994)。このようなシグナル伝達を効率化する翻訳後修飾のほかに、一部の $G\alpha$ はユビキチン化による制御を受けることが示唆されている。

ユビキチン化は標的蛋白質のリシン残基にユビキチン蛋白質が共有結合する翻訳後修飾である。ユビキチンはまず E1 ユビキチン活性化酵素により ATP 依存的に活性化され、E2 ユビキチン結合酵素に受け渡される。E2 ユビキチン結合酵素から基質へのユビキチンの受け渡しには E3 ユビキチンリガーゼが必要である。E3 ユビキチンリガーゼは活性化したユビキチン（及び E2 ユビキチン結合酵素）と基質蛋白質の両者を捕捉し、ユビキチンの受け渡しを触媒する酵素として作用する。基質蛋白質へのユビキチン化の特異性は E3 ユビキチンリガーゼによって決定されるため、膨大な数の E3 ユビキチンリガーゼがゲノムにコードされている。標的蛋白質に結合したユビキチンのリシン残基はさらにユビキチン化され、結果としてポリユビキチン鎖が形成される。ユビキチン分子内には 7 種のリシン残基が存在するが、特に 48 番目のリシン残基にリンクしたポリユビキチン鎖は 26S プロテアソームへのターゲッティングシグナルとなり、このポリユビキチン化された蛋白質は速やかに分解される。このため、ユビキチン化は蛋白質の安定性に関与していることが知られている(Voges et al., 1999; Weissman, 2001)。 $G\alpha$ のユビキチン化は分裂酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の $G\alpha$ である Gpa1 で見出されている(Madura and Varshavsky, 1994)。Gpa1 のユビキチン化はその蛋白質を不安定化することが示唆されているほか(Madura and Varshavsky, 1994)、その局在に関与することが報告されている(Wang et al., 2005b)。Gpa1 のユビキチン化部位は他の生物種の $G\alpha$ には保存されていない 110 アミノ酸残基から成る挿入配列中に存在することから(Marotti et al., 2002)、酵母以外の生物種の $G\alpha$ がユビキチン化による調節を受けているかどうかは明らかにされておらず、 $G\alpha$ の翻訳後の安定性や蛋白質量の調節機構はほとんど不明である。

RIC-8 (resistance to inhibitors of cholinesterase-8) は線虫の遺伝学的解析によってアセチルコリンエステラーゼ阻害剤に対する耐性遺伝子として同定された(Miller et al., 1996)。線虫における神経伝達物質の放出は G_q と G_o の 2 つの別々のシグナルによって二重に調節される細胞内 DAG 濃度によって支配されており、RIC-8 は G_q シグナルを調節する因子であることが示唆

された(Miller et al., 2000)。現在では線虫における神経伝達物質の放出のほかに、RIC-8 は $G_{i/o}$ ファミリー $G\alpha$ の調節因子として線虫の初期胚(Afshar et al., 2004; Miller and Rand, 2000)やショウジョウバエの神経芽細胞(David et al., 2005; Hampoelz et al., 2005; Wang et al., 2005a)の非対称分裂に関与することが知られている。

線虫やショウジョウバエといった無脊椎動物には 1 種類の Ric-8 しか存在しないのに対して、哺乳類には 2 つの線虫 RIC-8 のホモログが存在することから Ric-8A と Ric-8B と呼ばれている (図 2)。Ric-8A と Ric-8B ではアミノ酸レベルで約 45% の相同性を示し、 $G\alpha$ のサブクラスとの結合に対する特異性が異なっている。Ric-8A は $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_i$ 、及び $G\alpha_{12}$ と、Ric-8B は $G\alpha_q$ 及び $G\alpha_s$ と相互作用することが酵母ツーハイブリッド系により示された(Tall et al., 2003)。Ric-8A は *in vitro* で $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{i/o}$ 、 $G\alpha_{13}$ に対して GEF として機能し(Tall et al., 2003)、GPCR によって活性化された G_q シグナルを増強することから G 蛋白質シグナルの増幅因子として機能することが示唆されている(Nishimura et al., 2006)。一方、このような Ric-8A の研究から哺乳類におけるもう一つの線虫 Ric-8 のホモログである Ric-8B も GEF として機能すると考えられている。これと一致するように、ヒト胎児腎臓由来細胞である HEK293 細胞において、Ric-8B の過剰発現は $G\alpha_{olf}$ (G_s ファミリーに属する嗅覚系特異的な $G\alpha$) を介した細胞内 cAMP 産生を増強する(Von Dannecker et al., 2005)。さらに、ゼブラフィッシュにおける Ric-8B である *synembryn-like* の変異体では色素細胞形成不全が観察され、この表現系はアデニル酸シクラーゼの活性化剤である forskolin 処理でレスキューされる(Nagayoshi et al., 2008)。これらのことから、Ric-8B は G_s シグナルを正に調節する因子であると考えられている。しかしながら、Ric-8B の GEF 活性について解析した報告は無く、Ric-8B のシグナル伝達における機能は不明である。

本研究では、G 蛋白質シグナルの詳細な調節機構の解明を目指して未だ機能が明らかにされていない Ric-8B に注目して研究を行った。特に、これまでほとんど研究がなされていなかった G 蛋白質の翻訳後の安定性に注目し、G 蛋白質の発現量制御における Ric-8B の重要性を明らかにした。

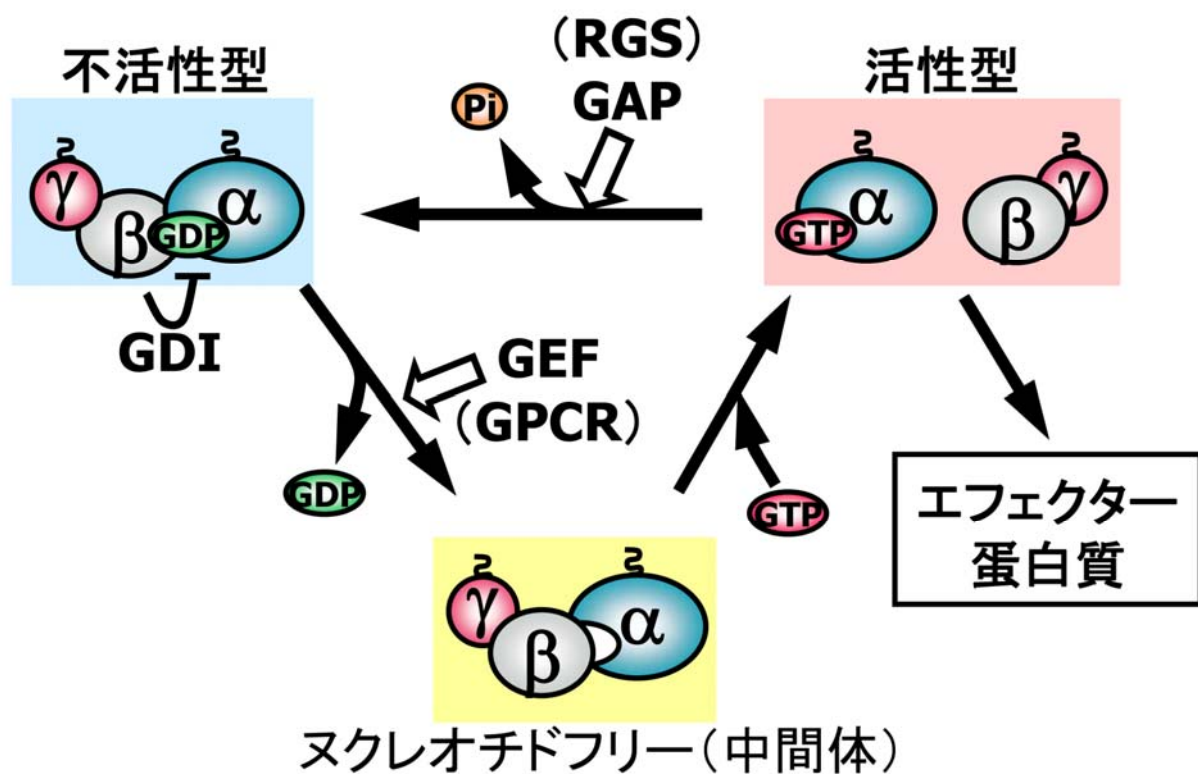


図 1 三量体 G 蛋白質のグアニンヌクレオチドサイクル

G 蛋白質は不活性状態では α 、 β 、 γ から成る三量体構造をとる。この時、 $G\beta\gamma$ は $G\alpha$ からの GDP の解離を抑制するグアニンヌクレオチド解離阻害分子 (GDI) として機能する。G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) はグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として $G\alpha$ のグアニンヌクレオチドの交換を促し、G 蛋白質の活性化を引き起こす。活性化した G 蛋白質は特異的なエフェクター蛋白質の活性を制御する。Regulator of G protein signaling (RGS) は GTPase-activating protein (GAP) として $G\alpha$ の GTP 加水分解活性を促進する。GDP と結合した $G\alpha$ は $G\beta\gamma$ と再び会合し、G 蛋白質シグナルは終結する。

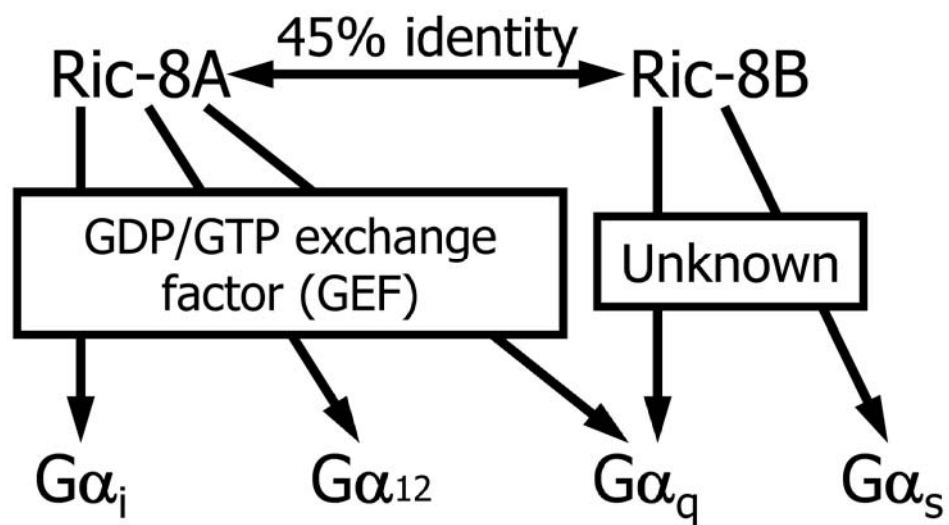


図 2 哺乳類 Ric-8 の Gα との結合に対する特異性

Ric-8A と Ric-8B はアミノ酸レベルで約 45% の相同性を有しており、矢印で結んだ Gα サブクラスと結合する。Ric-8A は結合する Gα に対して GEF として機能する。一方、Ric-8B の機能は明らかにされていない。

材料と方法

試薬

MG132、cycloheximide (CHX) は CALBIOCHEM から購入した。抗 FLAG (M2) 抗体 (1:1000)、抗 Tubulin 抗体 (1:1000)、3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX)、(-) propranolol は SIGMA、抗 actin 抗体 (1:1000)、抗 $G\alpha_{q/11}$ 抗体 (1:1000)、抗 $G\alpha_{13}$ 抗体 (1:1000)、抗 $G\beta$ 抗体 (1:1000)、抗 Myc 抗体 (1:1000) は SANTA CRUZ から購入した。抗 $G\alpha_i$ 抗体 (1:1500) は浅野富子博士 (愛知県心身障害者コロニー) から分与された。抗 $G\alpha_s$ ウサギポリクローナル抗体 (1:1000) はラット $G\alpha_s$ の C 末端 10 アミノ酸 (RMHLRQYELL) の N 末端にシステイン残基を付加した合成ペプチドを用いて作成したものを使用した。これらの抗体は () で示した希釈率で使用した。

遺伝子のクローニングとプラスミド構築

マウス Ric-8B (mRic-8B) をクローニングするために、マウス E16 全脳より TRIzol Reagent (Invitrogen) を用い、添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。逆転写反応は mRic-8B mRNA (GenBank accession number AY940666) の 3'-非翻訳領域で作成したプライマー (5'-TTTACCTGGGAGGCAGCGGC) と SuperScript III (Invitrogen) を用いて行った。得られた cDNA を鋳型として *Bam*H1 制限酵素部位を付加したプライマー (Forward; 5'-GGCGGATCCATGGATGAAGAGCGCGCCCT、Reverse; 5'-GGCGGATCCTCAGTCTGTGTCCGAGCTGG (下線部は *Bam*H1 制限酵素切断配列)) を用いて PCR を行った。DNA ポリメラーゼは PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa) を用い、以下の条件で PCR を行った。98°C 10 秒、60°C 5 秒、72°C 2 分を 30 サイクル。この PCR によって全長 mRic-8B の他にスプライシングバリエーションである Ric-8B Δ 9 (Von Dannecker et al., 2005) 及び Ric-8B Δ 3 Δ 9 を得た。得られた mRic-8B cDNA は *Bam*H1 で消化し、pCMV5 の *Bam*H1 制限酵素部位へ挿入した。

全長 Ric-8B の cDNA を pCMV5-FLAG ベクターの *Bgl*II 制限酵素部位に、pCMV-Myc 及び pGEX-6P-1 (GE Healthcare) の *Bam*HI 制限酵素部位に挿入した。Ric-8B Δ 9 及び Ric-8B Δ 3 Δ 9 の cDNA を pCMA5-FLAG の *Bgl*II 制限酵素部位に挿入した。

mRic-8B を標的とする short-hairpin (sh) RNA は以下のプライマーを用いて作成し、pSUPER-retro-puro (Oligoengine, Seattle) の *Bgl*II/*Hind*III 制限酵素部位に挿入した。Ric-8B#2 sense: 5'-GATCCCCACAGTTGGAAGGTGCATAATTCAAGAGATTATGCACCTTCCAACCTGTTTTTTA-3'; Ric-8B#2 antisense: 5'-AGCTTAAAAAA CAGTTGGAAGGTGCATAATCTCTTGAATTATGCACCTT

CCAACTGTGGG-3'; Ric-8B#3 sense: 5'-GATCCCCGGCAGCAACTCTAGATGAATTCAAGAGATTCATCTAGAGTTGCTGCCTTTT-3'; Ric-8B#3 antisense: 5'-AGCTTAAAAAGGCAGCAACTCTAGATGAATCTCTTGAATTCATCTAGAGTTGCTGCCGGG-3';

G α_s の発現コンストラクトとして bovine G $\alpha_{s-short}$ (スプライシングバリエント 4) を用い、本論文では単に G α_s と表記した。G α_i は rat G α_{i1} を用いた。G α_q は human G α_q を用いた。

pCMV-G α_s を *Xba*I と *Hind*III で消化し、得られた cDNA を pQE60 (Qiagen) 及び pFASTBac (Invitrogen) の *Xba*I/*Hind*III 制限酵素部位に挿入した。

pCDNA3.1-G α_{olf} は Missouri S&T cDNA Resource Center から購入した。pCDNA3.1-G α_{olf} を *Kpn*I と *Xho*I で消化し、得られた cDNA を pCMV5-FLAG の *Kpn*I/*Sal*I 制限酵素部位に挿入した。

G α_s と G α_i を組み換えた G $\alpha_{s/i}$ キメラコンストラクトはオーバーラップ PCR 法により作成した。それぞれのキメラコンストラクトのアミノ酸配列を以下に示す。G $\alpha_{s/i}$ -SWI_i: 1-185 of G $\alpha_{s-short}$, 177-195 of G α_i , 205-380 of G $\alpha_{s-short}$; G $\alpha_{s/i}$ -SWII_i: 1-214 of G $\alpha_{s-short}$, 206-217 of G α_i , 227-380 of G $\alpha_{s-short}$; G $\alpha_{s/i}$ -SWIII_i: 1-232 of G $\alpha_{s-short}$, 224-240 of G α_i , 250-380 of G $\alpha_{s-short}$ 。

His-Tag 融合ユビキチン発現ベクターである pMT107-6xHis-ubiquitin は Dirk Bohmann 博士 (University of Rochester, USA) より分与された (Treier et al., 1994)。

細胞培養と遺伝子導入

HEK293T 細胞と NIH3T3 細胞は 10% ウシ胎児血清、100 μ g/ml streptomycin 及び 100 units/ml penicillin を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA) を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。細胞への遺伝子導入はリン酸カルシウム法または LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) を用いて行った。ヨトウガ卵巣由来の細胞である Sf9 細胞は SF-900 II SFM (Invitrogen) を用い、27°C で振盪培養した。

レトロウィルスの調製と感染

HEK293T 細胞に ecotropic helper retroviral plasmid と pSUPER-retro-puro-shRic-8B をトランスフェクションし、トランスフェクション後 24-60 時間にレトロウィルスを含む培養上清を回収した。1 x 10⁵ 個の NIH3T3 細胞を 60 mm ディッシュに播き、翌日に 1.5 ml のレトロウィルスを含む培養上清に培地を交換し、終濃度 8 μ g/ml polybrene を加えた。2 時間後に再度感染を行った。感染後 24 時間後に 7.5 μ g/ml puromycin を含む培地で 2 日間、薬剤耐性細胞の選抜を行った。

リコンビナント蛋白質の発現と精製

以下の精製は全て 4℃で行った。精製蛋白質は-80℃で保存した。

i) GST-Ric-8B の精製

大腸菌発現系には宿主として B strain 由来の大腸菌株である Rosetta(DE3) pLysS 株 (Novagen) を用いた。pGEX-6P-1-Ric-8B によって形質転換した Rosetta (DE3) pLysS 株を LB 培地 (50 µg/ml Ampicillin 及び 34 µg/ml Chloramphenicol を含む) 中で OD₆₀₀ = 0.6 になるまで 37℃で振盪培養した。OD₆₀₀ = 0.6 に達したとき、氷上で 30 分間インキュベートした後に終濃度 0.4 mM IPTG を加え、20℃で 8 時間振盪培養することによって蛋白質発現を誘導した。8 時間後、遠心分離することによって菌体を回収した。回収した菌体を Extraction buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM MgCl₂、150 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM EDTA、20% glycerol、0.5% sodium cholate 及びプロテアーゼ阻害剤 (16 µg/ml PMSF、16 µg/ml *N*-tosyl-L-phenylalanine-chloromethyl ketone、16 µg/ml *N*α-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone、3.2 µg/ml leupeptin 及び 3.2 µg/ml lima bean trypsin inhibitor) を含む) に懸濁し、超音波破碎した。得られた細胞抽出液を 10,000 × *g* で 20 分間遠心分離し、得られた上清を蛋白質濃度が 1.0 - 1.5 mg/ml となるように Extraction buffer で希釈し、glutathione-Sepharose 4B (1ml resin/1 L 培養液、GE Healthcare) を加えた。1 時間穏やかに攪拌した後に、300 mM NaCl を含む Extraction buffer と Wash buffer (50 mM Tris-HCl、pH 7.5、5 mM MgCl₂、150 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM EDTA、10% glycerol 及び 0.7% CHAPS) でレジン进行を洗浄し、20 mM glutathione を含む Wash buffer で GST-Ric-8B を溶出した。Ric-8B は精製の過程で凝集体を形成することが報告されており (Tall et al., 2003)、GST-Ric-8B を凝集体から分離するためにさらにゲル濾過カラムにより精製した。5 mM MgCl₂、1 mM DTT、150 mM NaCl 及び 10% glycerol を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で平衡化した HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (GE Healthcare) に glutathione-Sepharose 溶出液を添加し、4℃、0.5 ml/min で分離した。排除体積及びその近傍ではなく約 160,000 の分子量を示す画分に溶出された GST-Ric-8B を回収し、30,000 MWCO Amicon Ultra (Millipore) で濃縮した。

ii) GST-Ric-8A の精製

GST-Ric-8A の精製は西村らの方法 (Nishimura et al., 2006) に改変を加えて行った。

Glutathione-Sepharose から溶出した GST-Ric-8A を 100 mM NaCl 及び 1 mM DTT を含む 20 mM HEPES-NaOH (pH 8.0) で平衡化した HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (GE Healthcare) に添加し、4℃、0.5 ml/min で分離した。凝

集体を含む排除体積のピークの後に溶出されてくる凝集していない GST-Ric-8A を回収し、30,000 MWCO Amicon Ultra (Millipore) で濃縮した。

iii) $G\alpha_q$ の精製

$G\alpha_q$ の精製は既報に従って行った(Kozasa, 2004)。 $G\alpha_q$, $G\beta_1$, and His- $G\gamma_2$ をコードするバキュロウィルスはイリノイ大学の小笹徹博士から分与された。

iv) 大腸菌発現系による $G\alpha_s$ の精製は既報に従って行った(Graziano et al., 1989; Itoh and Gilman, 1991)。

v) パルミトイル化された $G\alpha_s$ を調製するために、 $G\alpha_q$ 精製の方法(Kozasa, 2004)に改変を加えて Sf9 の膜画分から $G\alpha_s$ を精製した。

$G\alpha_s$ はバキュロウィルス-Sf9 発現系を用いて発現させ、精製を行った。 $G\alpha_s$ をコードする組み換えバキュロウィルスは Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen) を用いて添付のプロトコールに従って作製した。リコンビナント $G\alpha_s$ を発現させるために、Sf9 細胞を 2×10^6 細胞/ml の密度に増殖させ、Sf9 培養液に対して 1.5 %の $G\alpha_s$ 、4 %の $G\beta_1$ 、3 %の His- $G\gamma_2$ の割合でバキュロウィルスを共感染させ、48 時間振盪培養した。培養後、500 x g で遠心分離することによって細胞を回収した。

Sf9 細胞からの膜画分の調製と Ni-NTA による精製は $G\alpha_q$ 精製の方法に従って行った。Ni-NTA から溶出した $G\alpha_s$ を 10 mM KPO_4 、1 mM DTT 及び 0.7 % CHAPS を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化したハイドロキシアパタイトエコノパック CHT-II カートリッジ (Bio-Rad) にロードし、75 ml の 10 - 300 mM KPO_4 の直線濃度勾配で $G\alpha_s$ を溶出した。 $G\alpha_s$ はおよそ 100 - 200 mM KPO_4 で溶出された。この画分を 30,000 MWCO Amicon Ultra (Millipore) で濃縮し、2 mM $MgSO_4$ 、0.5 mM EDTA、100 mM NaCl、0.7 % CHAPS 及び 1 μ M GDP を含む 20 mM HEPES-NaOH (pH 8.0) に緩衝液を交換した。

vi) 抗原用 Ric-8B の発現及び精製

Ric-8B に対するポリクローナル抗体を調製するために、Ric-8B を大腸菌発現系により GST 融合 Ric-8B として発現させ、PreScission Protease (GE Healthcare) を用いて GST タグを除去した。

GST-Ric-8B の大腸菌における発現は上記の方法と同様にして行った。

回収した菌体を Extraction buffer-2 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM $MgCl_2$ 、1 mM DTT、1 mM EDTA、0.5% NP40 及びプロテアーゼ阻害剤を含む) に懸濁し、超音波破碎した。得られた細胞抽出液を 10,000 x g で 30 分間遠心分離し、得られた上清を蛋白質濃度が 1.5 mg/ml となるように Extraction

buffer-2 で希釈した後に 2 ml (bed-volume) glutathione-Sepharose 4B を充填した内径 14 mm のカラムに添加した。その後、300 mM NaCl を含む Extraction buffer、PreScission buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.0 at 4°C)、150 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM EDTA 及び 0.1% NP40 を含む) でレジン进行を洗淨した。レジン进行を 10 ml の PreScission buffer を用いて 15 ml チューブに回収し、20 分間穏やかに攪拌した後、遠心分離によりレジン进行を回収した。レジン进行に 120 units PreScission Pretease を含む 2 ml の PreScission buffer を加え、20 時間穏やかに攪拌した。レジン进行を内径 7 mm のカラムへ移し、2 ml の PreScission buffer を加え、切断された Ric-8B をカラムから溶出させた。溶出した Ric-8B は Spectra/Por membrane (Spectrum) を用いて透析することにより PBS に緩衝液を交換し、抗 Ric-8B 抗体作成のための抗原とした。

***In vitro* 結合実験**

100 nM GST-Ric-8B または GST と 100 nM $G\alpha_s$ または $G\alpha_q$ を Binding buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)、10 mM $MgCl_2$ 、100 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM EDTA 及び 0.05% Lubrol-PX を含む) 中、25°C でインキュベートした。1 時間後、glutathione-Sepharose 4B を加え、さらに 4°C で 1 時間穏やかに攪拌した。レジン进行を Binding buffer で 3 回洗淨し、SDS-PAGE Sample buffer で処理することにより吸着した蛋白質を抽出した。得られたサンプルを抗 $G\alpha_s$ 又は抗 $G\alpha_q$ 抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。

GTP γ S 結合実験

$G\alpha$ への GTP γ S 結合は filter-binding method を用いて評価した (Nishimura et al., 2006)。反応は 5 pmol (50 nM) の $G\alpha_s$ 又は $G\alpha_q$ を 10 μ M [35 S]GTP γ S (10,000 cpm/pmol、PerkinElmer) と 20 pmol (200 nM) の GST、GST-Ric-8A 又は GST-Ric-8B を含む Reaction buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)、100 mM NaCl、10 mM $MgCl_2$ 、1 mM DTT、1 mM EDTA 及び 0.05% C12E10 を含む) に加えることにより開始した (100 μ l 反応液)。 $G\alpha_q$ の場合は 0.05% C12E10 の代わりに 0.05% Genapol C-100 を用いた。反応は 20°C で行なった。反応は図に示した時間に反応液を一部 (20 μ l) とり、氷冷した stop buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.7)、100 mM NaCl、2 mM $MgSO_4$ 、0.05% Genapol C-100 及び 1 mM GTP を含む) を加え、NC45 nitrocellulose membrane (Whatman) に通すことによって停止した。膜を Wash buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.7)、100 mM NaCl 及び 2 mM $MgSO_4$ を含む) で 2 回洗淨し、室温で風乾した。膜に吸着した放射活性を LS6500 液体シンチレーションカウンター (Beckman Coulter Inc.) を用いて測定した。

免疫沈降

発現プラスミドをトランスフェクションした HEK293T 細胞を Lysis buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)、100 mM NaCl、3 mM MgCl₂、1 mM DTT、1 mM EDTA、0.5% NP40、1 µg/ml Leupeptin 及び 1 mM PMSF を含む) で可溶化し、14,000 x *g* で 5 分間遠心分離した。得られた上清を図中に示した抗体と Protein G-Sepharose (GE Healthcare) と共に 4°C で穏やかに攪拌した。攪拌後、レジンに Lysis buffer で 3 回洗浄し、SDS-PAGE Sample buffer で処理することにより免疫沈降物を溶出させた。溶出サンプルをウェスタンブロットに供した。

細胞分画

細胞を hypotonic buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)、3 mM MgCl₂、1 mM DTT、1 mM EDTA、1 µg/ml Leupeptin 及び 1 mM PMSF を含む) に懸濁した後、27-ゲージ注射針を用いて破碎した。細胞核と未破碎の細胞は 500 x *g*、4°C で 5 分間遠心分離することにより、細胞抽出液から分離した。得られた上清をさらに 100,000 x *g*、4°C で 30 分間遠心分離し、得られた上清と沈殿をそれぞれ可溶性画分と膜画分とした。

細胞内 cAMP 量の測定

NIH3T3 細胞又は HEK293T 細胞を 0.5 mM IBMX で 1 時間前処理し、10 µM isoproterenol 又は 10 nM pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) で図中又は図の説明に示した時間インキュベートした。反応は 0.1 N 塩酸を加えることにより停止した。

膜画分におけるアデニル酸シクラーゼ活性は、NIH3T3 細胞から調製した粗膜画分にリコンビナント Gα_s (rGα_s) を再構成することにより測定した。rGα_s (50 nM) を 10 mM MgCl₂、1 mM EDTA、1 mM DTT 及び 10 µM GTPγS を含む 20 mM HEPES-NaOH (pH 8.0) と 30°C で 30 分間インキュベートし、未結合の GTPγS を Zeba Desalt Spin Column (Thermo Scientific) を用いて除去した。粗膜画分と rGα_s-GTPγS を 4°C で 15 分間インキュベートし、基質液 (終濃度がそれぞれ 0.5 mM ATP、6 mM phosphoenolpyruvic acid、10 µg/ml pyruvate kinase 及び 0.02 mM IBMX) を加えることにより酵素反応を開始した。反応は 30°C で 30 分間行い、反応液と等量の 0.1 N 塩酸を加えることにより停止した。

cAMP の定量は AlphaScreen cAMP assay kit (PerkinElmer) を用いて添付プロトコールに従って行った。

リガンド結合実験

リガンド結合実験は NIH3T3 細胞から調製した粗膜画分と放射性標識された β -アドレナリン受容体 (β AR) アンタゴニストである [125 I]cyanopindolol (CYP、2200 Ci/mmol、PerkinElmer) を用いて行った。NIH3T3 細胞の粗膜画分は上述の方法で調製し、超遠心分離後の沈殿は 27 ゲージ注射針を用いて hypotonic buffer に再懸濁した。10 μ g (100 μ l 反応液) の膜蛋白質と [125 I]CYP を 30°C で 60 分間反応した。[125 I]CYP の非特異的結合は 10 μ M (-) propranolol 存在下における粗膜画分への結合として算出し、常に 20% 以下であった。結合反応は wash buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.5)、5 mM MgCl₂ を含む) を加え、速やかにガラス繊維濾紙 (GF/C、Whatman) で濾過することにより停止した。濾紙をさらに 5 ml の wash buffer で洗浄し、放射活性を COBRA 5003 gamma counter (PerkinElmer) で測定した。粗膜画分の β -アドレナリン受容体数を [125 I]CYP の飽和曲線のスキッチャード解析により求めた。

細胞内カルシウム測定

細胞内の遊離カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) はカルシウム指示薬である Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2/AM、Dojindo) を用いて測定した。NIH3T3 細胞をトリプシン/EDTA を用いて培養皿から剥がし、10 % FBS を含む Suspension buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)、140 mM NaCl、5.4 mM KCl、1.8 mM CaCl₂、0.8 mM MgCl₂ 及び 5.6 mM glucose) に懸濁した。懸濁した細胞を 5 μ M Fura-2AM を含む suspension buffer 中、30°C で 30 分間インキュベートした。その後、細胞を Suspension buffer で洗浄することにより細胞外の指示薬を除去した。1 x 10⁶ 個の細胞をカルシウム測定に用い、10 μ M UTP で細胞を刺激した。反応は 30°C で行った。340 nm と 380 nm の波長の蛍光を F-2000 fluorescence spectrophotometer (Hitachi) により測定した。

RT-PCR

HEK293T 細胞の全 RNA は TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて調製した。First-strand cDNA は 2 μ g の全 RNA から SuperScript II (Invitrogen) と Oligo-dT プライマーを用いて合成した。得られた cDNA を鋳型として human $G\alpha_s$ 又は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に対するプライマーを用いて以下の条件で PCR を行った。94°C 60 秒、61°C 60 秒、72°C 30 秒を 20 サイクル ($G\alpha_s$) 又は 25 サイクル (GAPDH)。PCR 産物は 2 % アガロースゲルで分離し、エチジウムブロミドで染色することにより解析した。使用したプライマーを以下に示す。 $G\alpha_s$ forward: 5'-GCACCATTGTGAAGCAGATG-3'; $G\alpha_s$ reverse: 5'-TCATCCTCCCACAGAGCCTT-3'; GAPDH forward: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; GAPDH reverse: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-

3'.

シクロヘキシミド (CHX) チェイス実験

HEK293T 細胞に LipofectAMINE2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションし、24 時間後に 60 mm 培養皿に播き直した。80 %コンフルエントの細胞を 100 $\mu\text{g/ml}$ CHX で図中に示した時間処理した。細胞を遠心分離により回収し、lysis buffer (20 mM HEPES-NaOH、pH 7.5、100 mM NaCl、3 mM MgCl_2 、1 mM EDTA、1 mM DTT、0.5% NP-40、1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin 及び 1 mM PMSF) を用いて細胞抽出液を調製した。得られた細胞抽出液をウェスタンブロットにより解析した。

ユビキチンアッセイ

細胞内における $\text{G}\alpha_s$ のユビキチン化は Kuo らの方法に従って解析した (Kuo et al., 2004)。HEK293T 細胞に pMT107-6xHis-ubiquitin を含む発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間後にプロテアソーム阻害剤である 10 μM MG132 を含む DMEM へ培地交換した。12 時間後、細胞を Urea-Lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH8.0)、10 mM NaH_2PO_4 、8 M Urea、10% Glycerol、0.1% Triton-X100、0.5 M NaCl、10 mM Imidazole 及び 10 mM 2-Mercaptoethanol) に懸濁して超音波破碎した。細胞抽出液に 20 μl (bed-volume) の Ni-NTA (Qiagen) を加え、4 - 8 時間穏やかに攪拌した。攪拌後、レジンを 20 mM Imidazole を含む Urea-Lysis buffer で 4 回洗浄し、150 μl の Ubiquitin-Elution buffer (150 mM Tris-HCl (pH 6.8)、200 mM Imidazole、5% SDS、30% Glycerol 及び 0.72 M 2-Mercaptoethanol を含む) を加えて溶出させた。以上の手順は室温で行った。溶出サンプルを直接 SDS-PAGE に供し、ウェスタンブロットにより解析した。

結果

1) Ric-8B の発現分布

マウス組織における Ric-8B の発現分布を調べるために、成体マウスの各組織から組織抽出液を調製し、抗 Ric-8B 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。Ric-8B は調製したすべての組織において発現が確認された (図 3A)。また、さまざまな培養細胞株において Ric-8B の発現を調べた結果、調べたすべての培養細胞株で発現が確認された (図 3B)。以上の結果から、Ric-8B は発現レベルの差はあるものの、ユビキタスに発現していることが示唆された。

2) $G\alpha_s$ と $G\alpha_q$ の $GTP\gamma S$ 結合に対する Ric-8B の効果

線虫 RIC-8 及び哺乳類 Ric-8A が $G\alpha$ に対する GEF として機能することが *in vitro* の解析により証明されていることから (Tall et al., 2003)、Ric-8B も GEF として機能すると考えられていた。しかし、これまでに Ric-8B の GEF 活性の有無を検証した報告は無かった。そこで Ric-8B の $G\alpha$ に対する GEF 活性について *in vitro* において検討するために、GST-Ric-8B リコンビナント蛋白質を調製し、まず GST-Ric-8B と $G\alpha_q$ 又は $G\alpha_s$ の結合を検討した。GST-Ric-8B と $G\alpha_q$ 又は $G\alpha_s$ をインキュベーションした後、glutathione-Sepharose を用いて pull-down を行った。 $G\alpha_q$ 及び $G\alpha_s$ は GST-Ric-8B と共沈降し、Ric-8B と $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_s$ が直接結合することを確認した (図 4)。次に $G\alpha$ への $GTP\gamma S$ の結合に対する Ric-8B の効果を検討した。これまでに報告されているように、GST-Ric-8A は $G\alpha_q$ の $GTP\gamma S$ 結合速度を顕著に促進したが、GST-Ric-8B は影響を与えなかった (図 5A)。また、 $G\alpha_q$ の時と同様に GST-Ric-8B は $G\alpha_s$ の $GTP\gamma S$ 結合にも影響を与えなかった (図 5B)。これらの実験において、 $G\alpha_q$ は Sf9 から、 $G\alpha_s$ は大腸菌から精製したものをを用いた。未修飾の $G\alpha_{i1}$ よりも N 末端がミリスチル化された $G\alpha_{i1}$ はより効率的に Ric-8A によってグアニンヌクレオチド交換反応が促進されることが報告されている (Tall and Gilman, 2005)。このことは Ric-8A による効率的なグアニンヌクレオチド交換に $G\alpha$ の脂質修飾が促進的に働くことを示している。 $G\alpha_s$ はミリスチル化修飾を受けないが、N 末端にパルミトイル化修飾を受けている (Kleuss and Krause, 2003; Mumby, 1997)。そこで、Ric-8B の GEF 活性に $G\alpha_s$ のパルミトイル化が必要かどうか調べるために、Sf9 細胞の膜面分から $G\alpha_s$ を調製し、 $GTP\gamma S$ 結合に対する GST-Ric-8B の効果を検討した。しかしながら、大腸菌から精製した $G\alpha_s$ と同様に、GST-Ric-8B は Sf9 細胞の膜面分から精製した $G\alpha_s$ の $GTP\gamma S$ 結合速度に影響を与えなかった (図 5C)。以上の結果は、Ric-8B が *in vitro* において $G\alpha$ に対する GEF として機能しないことを示している。

3) Ric-8B ノックダウンによりイソプロテレノール刺激による cAMP 産生が減弱する

これまでに、以下のような Ric-8B が G_s シグナルにおける正の制御因子であることを示唆する結果が報告されている。1) Ric-8B の過剰発現により G_s ファミリーに属する嗅覚系特異的 G 蛋白質である $G\alpha_{olf}$ を介した cAMP 産生が増強する (Von Dannecker et al., 2005)、2) ゼブラフィッシュ Ric-8B である *synembryn-like* の変異によりメラノソーム形成が異常になり、この表現系がアデニル酸シクラーゼ活性化剤である forskolin でレスキューされる (Nagayoshi et al., 2008)。そこで、まず内在性 Ric-8B が G_s シグナルに関わるかどうか調べるために、2 種類の Ric-8B に対する shRNA (shRic-8B#2 と #3) を設計した。NIH3T3 細胞にこれらの shRic-8B をレトロウイルスにより導入することにより、内在性 Ric-8B の発現を効率的に抑制されることをウェスタンブロットで確認した (図 6A)。コントロール細胞では β アドレナリン受容体 (β AR) アゴニストであるイソプロテレノールに応答して経時的な細胞内 cAMP の蓄積が見られた。一方、Ric-8B をノックダウンした細胞では cAMP 応答が顕著に減少していた (図 6B、C)。この cAMP 応答は Ric-8B 蛋白質発現量と相関していた (図 6A 及び C)。これらの結果は、Ric-8B が G_s シグナルを正に制御していることを示唆している。

4) Ric-8B の G_q シグナル及び増殖因子刺激による MAP キナーゼ活性化に対する役割

Ric-8B は $G\alpha_s$ の他に $G\alpha_q$ と結合することから (図 4)、 G_q シグナルにも影響を与えることが考えられた。 G_q シグナルの活性化は細胞内カルシウム濃度の一過的な上昇を引き起こすことが知られている。そこで、NIH3T3 細胞において $G\alpha_q$ を介した細胞内カルシウム濃度上昇における Ric-8B ノックダウンの効果を検討した。UTP 刺激による $G\alpha_q$ を介した細胞内カルシウム濃度の上昇に対して Ric-8B のノックダウンは有意な影響を与えなかった (図 7A)。このように Ric-8B は G_s シグナルと G_q シグナルに対して異なる作用を示すことから、細胞内において Ric-8B の $G\alpha_s$ と $G\alpha_q$ に対する親和性に差があるのではないかと考え、細胞内における $G\alpha_s$ 又は $G\alpha_q$ と Ric-8B の相互作用を免疫沈降法により解析した。HEK293T 細胞に FLAG タグを付加した $G\alpha_s$ 又は $G\alpha_q$ をトランスフェクションし、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した際の内在性 Ric-8B の共沈降をウェスタンブロットで解析した。Ric-8B が $G\alpha_q$ より $G\alpha_s$ に対してより強い相互作用を持つ可能性が示唆された (図 8)。さらに Ric-8B のノックダウンは platelet-derived growth factor (PDGF) 刺激による extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化に対しても作用を示

さなかった (図 7B)。これらの結果から、Ric-8B が G_s シグナル特異的に機能することが示唆された。

5) Ric-8B は細胞内の $G\alpha_s$ 蛋白質量を特異的に調節する

Ric-8B による G_s シグナル調節の作用機序を明らかにするために、Ric-8B ノックダウン細胞における $G\alpha$ 及び $G\beta$ 蛋白質の発現量をウェスタンブロットにより調べた。驚いたことに、Ric-8B のノックダウンにより $G\alpha_s$ 蛋白質量の劇的な減少が観察された (図 9A)。この効果は他の $G\alpha$ 及び $G\beta$ では見られなかった。これとは反対に、Ric-8B の過剰発現により $G\alpha_s$ 蛋白質量は顕著に増加した (図 9B)。一方、Ric-8B 過剰発現は $G\alpha_s$ mRNA 量に作用を示さなかったことから (図 9B)、Ric-8B による $G\alpha_s$ 量の調節は蛋白質レベルであることが示唆された。

アゴニスト刺激による cAMP 産生には G 蛋白質の他に、GPCR 及びアデニル酸シクラーゼが必要である。すなわち、GPCR やアデニル酸シクラーゼの発現や機能の低下も cAMP 産生に影響を及ぼすことが考えられた。そこで、Ric-8B ノックダウン細胞における β AR の発現量とアデニル酸シクラーゼ活性を測定した。まず、 β AR の発現量を調べるために、NIH3T3 細胞から調製した粗膜画分と放射性標識された β AR アンタゴニストである [125 I]-iodocyanopindolol (CYP) を用いたリガンド結合実験を行い、内在性 β AR 発現量をスキッチャード解析により算出した。Ric-8B のノックダウンによる β AR 発現量に変動は見られなかった (図 10A)。次に、Ric-8B のノックダウンによりアデニル酸シクラーゼ活性に影響が見られるかどうか検討するために、NIH3T3 細胞から調製した粗膜画分を用いた $G\alpha_s$ 再構成実験を行った。Ric-8B をノックダウンした細胞から調製した膜蛋白質とあらかじめ GTP γ S を結合させたリコンビナント $G\alpha_s$ (r $G\alpha_s$) をインキュベーションし、ATP を含む基質液を反応液に添加することにより cAMP 産生を開始した。Ric-8B のノックダウンによるアデニル酸シクラーゼ活性の変動は観察されなかった (図 10B)。これらの結果により、Ric-8B ノックダウンによる cAMP 産生阻害は、受容体やアデニル酸シクラーゼの発現や機能変化によるものではなく $G\alpha_s$ 蛋白質発現量の減少によるものであることが強く示唆された。

6) Ric-8B は $G\alpha_s$ 蛋白質の分解とユビキチン化を抑制する

これまでの結果から、Ric-8B は $G\alpha_s$ の遺伝子発現ではなく蛋白質の安定性を制御することが示唆された。そこで、蛋白質分解系の一つとしてよく知られているユビキチン-プロテアソーム系に注目した (Weissman, 2001)。 $G\alpha_s$ がユビキチン-プロテアソーム系によって分解されるかどうかは不明であったので、 $G\alpha_s$ がユビキチン-プロテアソーム系による調節を受けるかどうか検討

した。HEK293T 細胞にプロテアソーム阻害剤である MG132 を処理することにより、内在性 $G\alpha_s$ の蛋白質量が増加した (図 11A)。この結果は $G\alpha_s$ 蛋白質がプロテアソーム系により分解されていることを示唆している。さらに、MG132 処理により pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 刺激による cAMP 産生が増強した (図 11B)。次に、Ric-8B が $G\alpha_s$ 蛋白質の安定性に関与するかどうか調べるために、HEK293T 細胞を蛋白質合成阻害剤である cycloheximide (CHX) で処理し、内在性 $G\alpha_s$ 蛋白質量の変化を調べた。コントロール細胞では CHX 処理による経時的な $G\alpha_s$ 蛋白質の減少、すなわち分解が観察されたが、FLAG-Ric-8B の過剰発現によりこの $G\alpha_s$ 蛋白質の分解は阻害された (図 11C)。このことは Ric-8B が細胞内の $G\alpha_s$ 蛋白質を安定化することを示しており、Ric-8B が $G\alpha_s$ のユビキチン化に影響を与える可能性が考えられた。まず、 $G\alpha_s$ が細胞内でユビキチン化されるかどうか調べた。HEK293T 細胞に His タグを付加したユビキチン (His-Ub) と $G\alpha_s$ をトランスフェクションし、MG132 を処理した後、細胞を回収し、変性条件化で細胞を破碎した。His-Ub 化された蛋白質を Ni アガロースレジンで pull down し、抗 $G\alpha_s$ 抗体を用いたウェスタンブロットにより特異的に $G\alpha_s$ のユビキチン化を検出した。その結果、ユビキチン化された $G\alpha_s$ のラダー状のバンドが観察され、このバンド強度は MG132 処理により増強した (図 11D)。これらのことは細胞内において $G\alpha_s$ がユビキチン化され、プロテアソーム系により分解されていることを示している。次に、Ric-8B が $G\alpha_s$ のユビキチン化に作用を示すかどうか調べた。FLAG-Ric-8B の共発現により lysate における $G\alpha_s$ 量は増加し、ユビキチン化された $G\alpha_s$ のバンドは消失した (図 11D)。これらの結果は $G\alpha_s$ がユビキチン-プロテアソーム系の新規基質蛋白質であると共に、Ric-8B が $G\alpha_s$ のユビキチン化と分解を抑制することにより $G\alpha_s$ 蛋白質の安定性を調節することを強く示唆している。

7) Ric-8B と $G\alpha_s$ の結合が $G\alpha_s$ ユビキチン化の阻害に重要である

Ric-8B は $G\alpha_s$ と *in vitro* 及び細胞内において結合する。Ric-8B による $G\alpha_s$ のユビキチン化阻害の詳細な作用機序を明らかにするため、Ric-8B と $G\alpha_s$ の結合が $G\alpha_s$ のユビキチン化の阻害に重要であるか検討した。まず、この仮説を検証するために Ric-8B のスプライシングバリエントを用いた解析を行った。Ric-8B 遺伝子は 10 個のエキソンからコードされており、Ric-8B Δ 9 はエキソン 9 を欠いており、 $G\alpha_s$ ファミリーの 1 つである $G\alpha_{olf}$ との結合能が非常に低下したバリエントであることが報告されている (Von Dannecker et al., 2005)。一方、Ric-8B Δ 3 Δ 9 は本研究で新たに見出されたバリエントで、エキソン 3 と 9 の両方を欠く (図 12A)。まず、これらのバリエントが $G\alpha_s$ と細胞内で相互作用するかどうか調べるために、免疫沈降法による解析を行

った。HEK293T 細胞に FLAG-Ric-8B 全長 (FL)、 $\Delta 9$ 又は $\Delta 3\Delta 9$ をトランスフェクションし、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した際の $G\alpha_s$ の共沈降をウェスタンブロットで検出した。FLAG-Ric-8BFL は $G\alpha_s$ との相互作用が見られたが、FLAG-Ric-8B $\Delta 9$ 及び $\Delta 3\Delta 9$ は $G\alpha_s$ と相互作用しなかった (図 12B)。次にこれらのバリエーションの $G\alpha_s$ のユビキチン化に対する作用を検討した。これまでの結果と同様に、FLAG-Ric-8BFL は $G\alpha_s$ のユビキチン化を抑制したが、FLAG-Ric-8B $\Delta 9$ 及び $\Delta 3\Delta 9$ は抑制効果を示さなかった (図 12C)。これらの結果は、Ric-8B と $G\alpha_s$ の結合がそのユビキチン化の抑制に重要であることを示唆している。

さらに結合の重要性を確認するために、Ric-8B とは結合しない $G\alpha_s$ 変異体を作成し、そのユビキチン化における Ric-8B の作用を調べた。Ric-8B は $G\alpha_s$ と結合するが、 $G\alpha_i$ とは結合しないことが酵母ツーハイブリッド法を用いた解析により示されている (Tall et al., 2003)。まず、Ric-8B が哺乳動物細胞内においても同様の特異性を示すかどうか調べるために、免疫沈降法を用いた解析を行った。HEK293T 細胞に FLAG- $G\alpha$ と Myc-Ric-8B をトランスフェクションし、抗 Myc 抗体で免疫沈降した際の FLAG- $G\alpha$ の共沈降をウェスタンブロットで検出した。FLAG- $G\alpha_s$ は Myc-Ric-8B との共沈降を示したのに対し、FLAG- $G\alpha_i$ は共沈降を示さなかった (図 13A)。この結果により、哺乳動物細胞内においても Ric-8B は $G\alpha_i$ とは結合しないことが示された。そこで、Ric-8B と結合しない $G\alpha_s$ を作成するために、 $G\alpha_s$ と $G\alpha_i$ を組み換えた $G\alpha_{s/i}$ キメラコンストラクトを設計した。 $G\alpha$ は $G\beta\gamma$ やエフェクター蛋白質との結合に必要な 3 つのスイッチ領域 (SWI、SWII、SWIII) を持っており、 $G\alpha_s$ のそれぞれのスイッチ領域を $G\alpha_i$ に置換したキメラコンストラクトを作成した ($G\alpha_{s/i}$ SWI_i、 $G\alpha_{s/i}$ SWII_i、 $G\alpha_{s/i}$ SWIII_i、図 13B)。まず、これらのキメラ蛋白質が細胞内で適切な構造を保持しているか調べるために、フッ化アルミニウム (AlF_4^-) 処理による G 蛋白質の活性化を免疫沈降法により解析した。HEK293T 細胞に各種キメラ蛋白質、 $G\beta_1$ 及び FLAG- $G\gamma_2$ をトランスフェクションした。細胞を AlF_4^- で 2 時間処理した後に回収し、細胞抽出液を抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降に供した。その後、 $G\beta\gamma$ とキメラ蛋白質の結合をウェスタンブロットで解析した。野生型 (WT) $G\alpha_s$ と同様に、各種キメラ蛋白質は AlF_4^- 処理依存的に $G\beta\gamma$ から解離した (図 13C)。このことは今回作成したキメラ蛋白質が細胞内において適切なコンフォメーションを保持していることを示している。次に、これらのキメラ蛋白質と Ric-8B の結合を免疫沈降法により解析した。HEK293T 細胞に FLAG-Ric-8B と各種キメラ蛋白質をトランスフェクションし、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した際のキメラ蛋白質の共沈降をウェスタンブロットで検出した。野生型 $G\alpha_s$ と比較して各種キメラ蛋白質は Ric-8B との共沈降量が減少していた。特に、 $G\alpha_s$ の SWII

を $G\alpha_i$ 置換した $G\alpha_{s/i}SWII_i$ キメラ蛋白質は劇的に Ric-8B との結合能が低下していた (図 13D)。そこで、 $G\alpha_{s/i}SWII_i$ キメラ蛋白質のユビキチン化と Ric-8B の作用を調べた。 $G\alpha_{s/i}SWII_i$ キメラ蛋白質は $G\alpha_s$ WT と同様に細胞内においてユビキチン化された。しかし、 $G\alpha_s$ WT のユビキチン化は FLAG-Ric-8B との共発現により抑制されたが、 $G\alpha_{s/i}SWII_i$ キメラ蛋白質のユビキチン化には FLAG-Ric-8B は作用を示さなかった (図 13E)。以上の Ric-8B スプライシングバリエーションを用いた解析と $G\alpha_{s/i}$ キメラ蛋白質を用いた解析により、Ric-8B と $G\alpha_s$ の結合がそのユビキチン化の抑制に重要であることが強く示唆された。

8) $G\alpha_{olf}$ のユビキチン化と Ric-8B による阻害

以上の結果により Ric-8B は $G\alpha_s$ のユビキチン化を抑制することによって G_s シグナルを安定化していることが示された。これまでに、HEK293T 細胞において Ric-8B を過剰発現することにより $G\alpha_{olf}$ を介した cAMP 産生が増強されることが報告されているが (Von Dannecker et al., 2005)、その作用機序は明らかにされていない。 $G\alpha_{olf}$ は $G\alpha_s$ ファミリーの 1 つであり (アミノ酸レベルでの相同性は約 80 %)、 $G\alpha_s$ と同様にアデニル酸シクラーゼの活性化を介して cAMP 産生を誘導する。これらのことから、Ric-8B が $G\alpha_{olf}$ に対しても安定化因子として機能する可能性が考えられた。そこで、Ric-8B が $G\alpha_{olf}$ のユビキチン化に対しても抑制的に機能するかどうか調べた。まず、Ric-8B と $G\alpha_{olf}$ の細胞内における相互作用を検討した。HEK293T 細胞に FLAG- $G\alpha$ と Myc-Ric-8B をトランスフェクションし、抗 Myc 抗体で免疫沈降した際の FLAG- $G\alpha$ の共沈降をウェスタンブロットで検出した。FLAG- $G\alpha_s$ 及び FLAG- $G\alpha_{olf}$ は共に Myc-Ric-8B と共沈降を示した (図 14A 最上段のパネル)。また $G\alpha_s$ と同様に、Myc-Ric-8B との共発現により FLAG- $G\alpha_{olf}$ の発現量は増加した (図 14A 最下段のパネル)。次に、 $G\alpha_{olf}$ のユビキチン化と Ric-8B による阻害について検討した。FLAG- $G\alpha_{olf}$ は FLAG- $G\alpha_s$ と同様にユビキチン化され、さらに Myc-Ric-8B の共発現によりそのユビキチン化は抑制された (図 14B)。これらの結果から、Ric-8B による嗅覚系シグナルの増強作用が $G\alpha_{olf}$ のユビキチン化の抑制という作用で説明できる可能性が示唆された。

9) $G\alpha_s$ は細胞膜でユビキチン化される

これまでの報告により、Ric-8B の過剰発現により細胞膜近傍又は膜画分における $G\alpha_{olf}$ の発現量が上昇することが免疫染色又は膜画分を用いたウェスタンブロットにより示されている (Kerr et al., 2008; Von Dannecker et al., 2006)。このことは Ric-8B が細胞膜に局在する $G\alpha_{olf}$ (及び $G\alpha_s$) を安定化していることを示唆している。しかしながら、 $G\alpha_s$ は主に細胞膜に局在する一

方、Ric-8B は細胞質蛋白質であり、Ric-8B が細胞内のどこで $G\alpha_s$ のユビキチン化を阻害しているか不明である。この問題を明らかにするために、 $G\alpha_s$ が細胞膜あるいは細胞質のどちらでユビキチン化されているか調べた。HEK293T 細胞を MG132 で処理した後に細胞を回収し、低張緩衝液中でホモジナイズすることにより細胞を破碎し、超遠心分離により膜画分 (P) と可溶性画分 (S) に分離した。 $G\beta$ は細胞膜マーカー、Ric-8A は可溶性マーカーとして用いた。MG132 処理により、特に膜画分において内在性 $G\alpha_s$ の増加が見られた (図 15A)。次にユビキチン化 $G\alpha_s$ の細胞内局在を検討した。HEK293T 細胞に $G\alpha_s$ と His-Ub をトランスフェクションし、膜画分と可溶性画分に分画した後、それぞれの画分についてユビキチンアッセイを行った。 $G\alpha_s$ を過剰発現させると lysate 中には膜画分と可溶性画分の両方に $G\alpha_s$ が検出されるが、大部分のユビキチン化 $G\alpha_s$ は膜画分で検出された (図 15B)。これらのことは $G\alpha_s$ のユビキチン化が細胞膜で起こることを示唆している。

次に、細胞膜上の Ric-8B が $G\alpha_s$ のユビキチン化抑制活性を持つかどうか調べるために、c-Src のミリスチル化修飾配列を Ric-8B の N 末端に融合した変異体 (Myr-Ric-8B) を作成し (図 16A)、強制的に膜移行させた Ric-8B の $G\alpha_s$ ユビキチン化の抑制について検討した。野生型 Ric-8B (WT) は大部分が可溶性画分に局在し、膜画分には一部しか存在しない。一方、Myr-Ric-8B は WT と比較して膜画分に存在する量が増加した (図 16B)。この Myr-Ric-8B は WT より強く $G\alpha_s$ のユビキチン化を抑制した (図 16C)。以上の結果は、膜に局在する Ric-8B が細胞膜における $G\alpha_s$ のユビキチン化を抑制することによって $G\alpha_s$ を安定化することを示唆している。

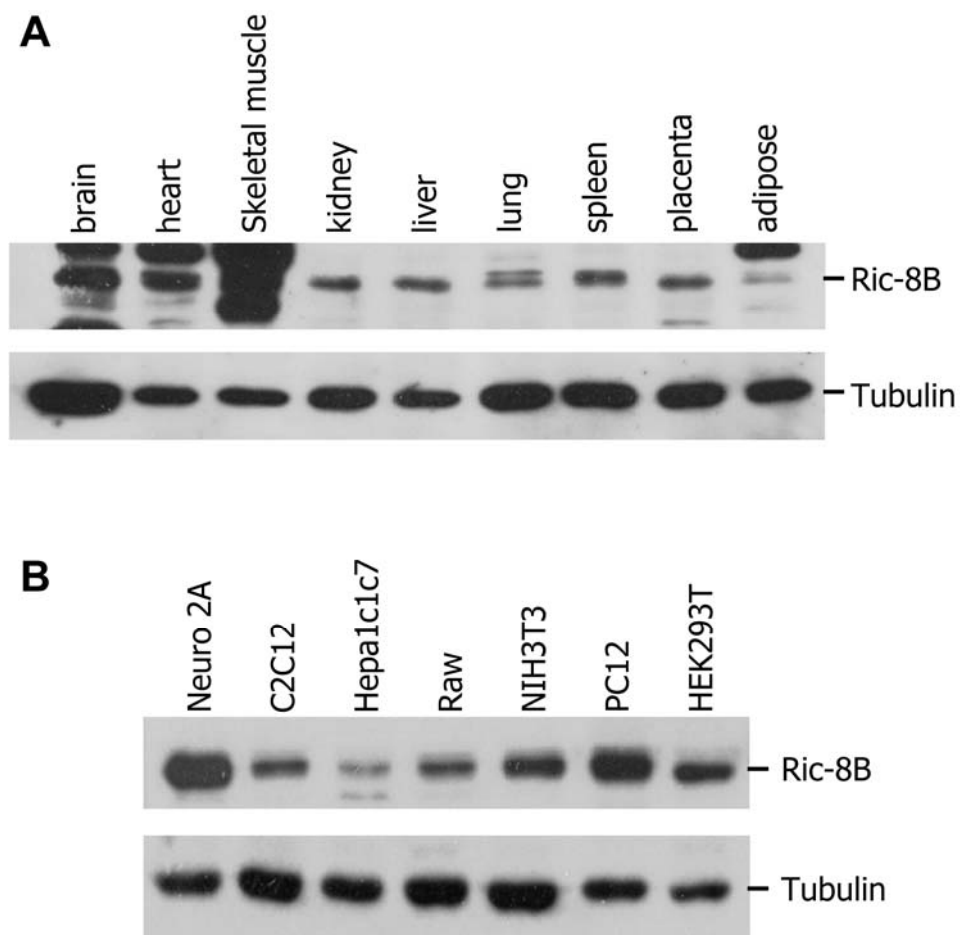


図 3 Ric-8B の発現解析

成体マウス組織（A）又は各種培養細胞（B）から細胞抽出液を調製した。1 レーンあたり 10 μ g 蛋白質を抗 Ric-8B 抗体及び抗 Tubulin 抗体を用いたウェスタングロットに供した。

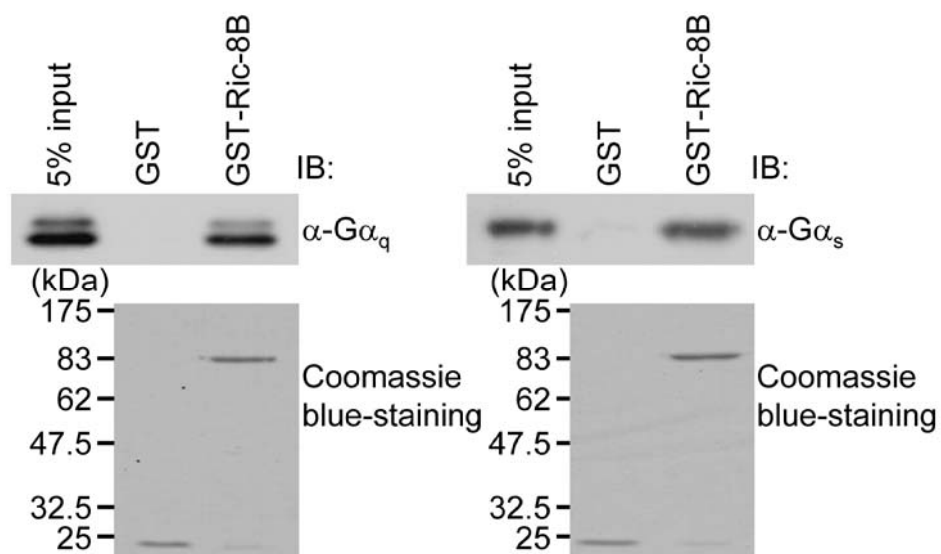


図 4 *in vitro* における Ric-8B と $G\alpha_q$ 又は $G\alpha_s$ の結合

100 nM GST 又は GST-Ric-8B を 100 nM $G\alpha_q$ (左) 又は $G\alpha_s$ (右) と 25°C で 1 時間インキュベーションし、glutathione-Sepharose を用いて pull down した。レジンを Binding buffer で洗浄し、SDS-sample buffer で処理することにより吸着した蛋白質を溶出した。共沈降した $G\alpha_q$ 又は $G\alpha_s$ をウェスタンブロットで検出した (上図)。下図は溶出したサンプルをクマシーブリリアントブルーで染色したものを示す。

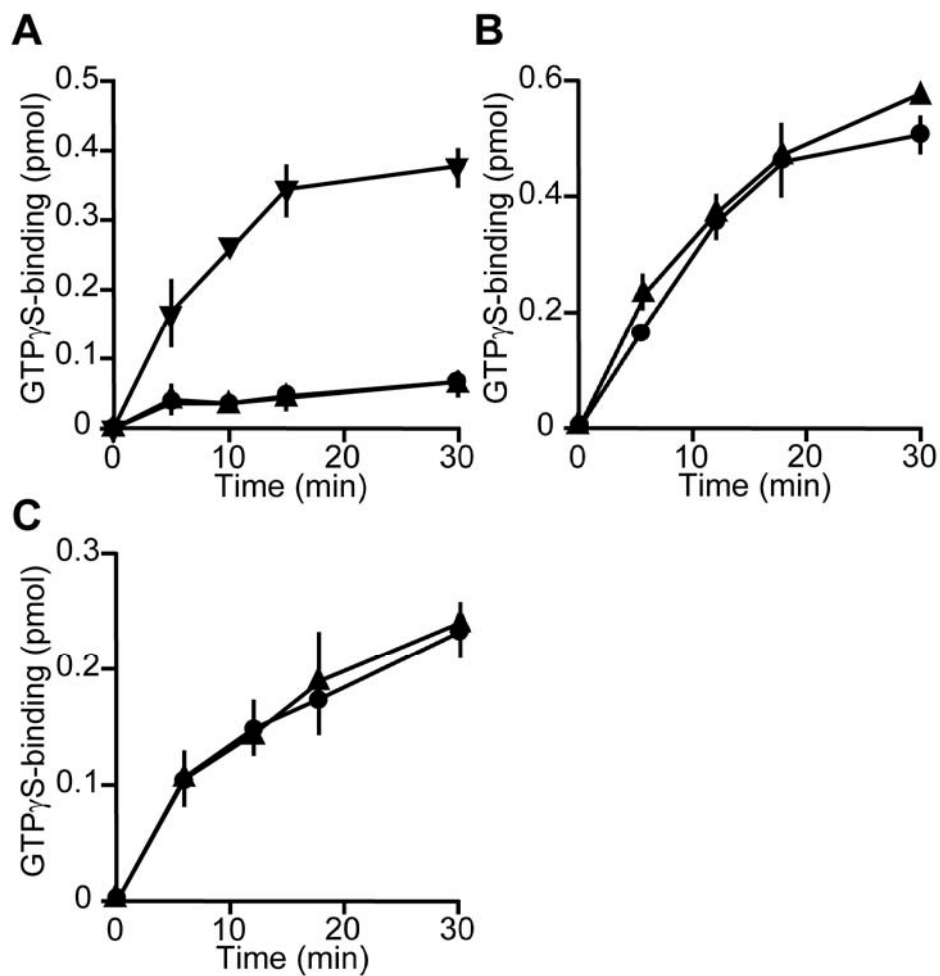


図 5 $G\alpha_q$ 又は $G\alpha_s$ の $GTP\gamma S$ 結合に対する Ric-8B の効果

200 nM GST (▲)、GST-Ric-8B (●) 又は GST-Ric-8A (▼) と 50 nM $G\alpha_q$ (A)、大腸菌から調製した $G\alpha_s$ (B) 又は Sf9 から調製した $G\alpha_s$ (C) を [35 S] $GTP\gamma S$ と共にインキュベーションし、経時的な $G\alpha$ への $GTP\gamma S$ 取り込みを測定した。それぞれの値は 3 回の独立した実験からの平均値と標準偏差を示す。

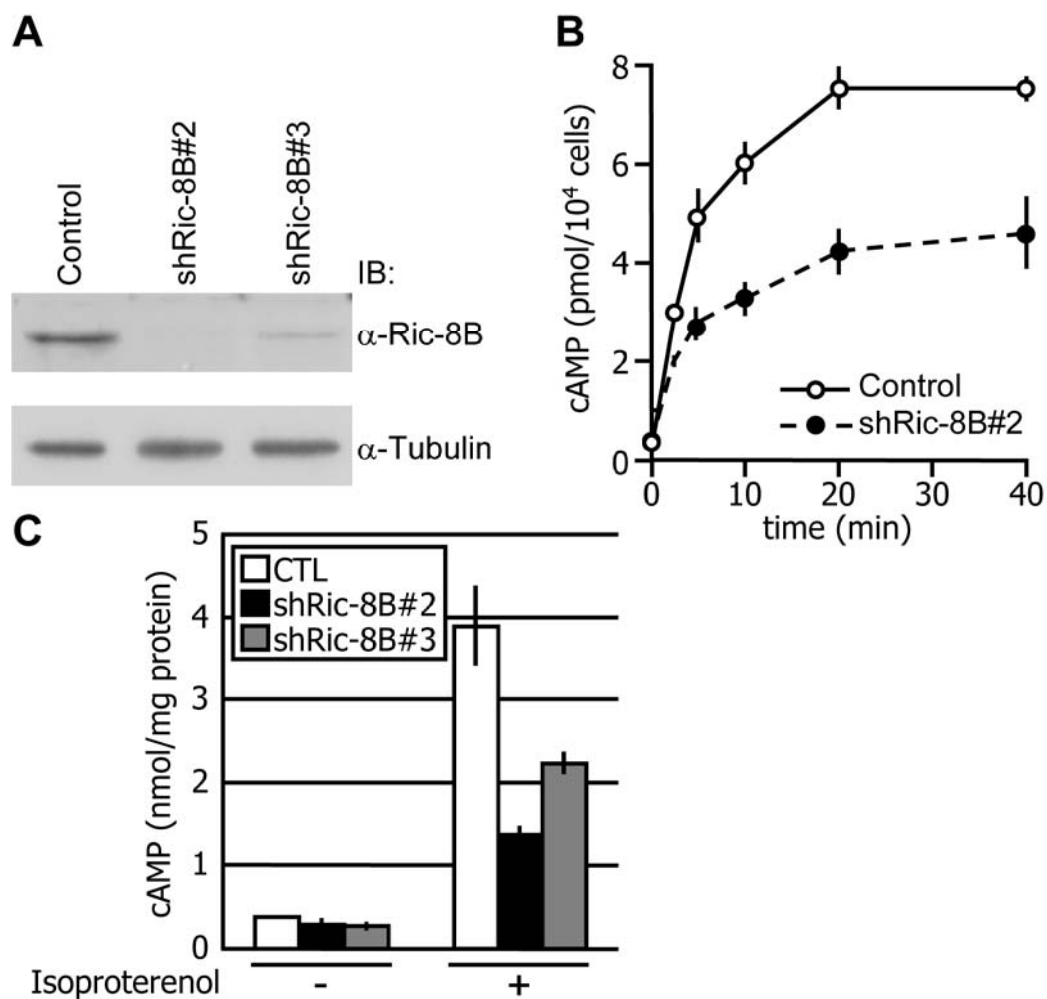


図 6 Isoproterenol 刺激による cAMP 産生に対する Ric-8B ノックダウンの効果

(A) NIH3T3 細胞にコントロールベクター又は 2 つの異なるマウス Ric-8B に対する shRNA (shRic-8B#2 又は shRic-8B#3) をコードしたレトロウィルスに感染し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液を抗 Ric-8B 抗体及び抗 Tubulin 抗体を用いたウェスタンブロットに供した。

(B) NIH3T3 細胞にコントロールベクター (○) 又は shRic-8B#2 (●) をコードしたレトロウィルスに感染した。細胞を 10 μ M Isoproterenol で刺激し、図に示した時間における cAMP 量を測定した。それぞれの値は 3 回の独立した実験からの平均値と標準偏差を示す。

(C) NIH3T3 細胞にコントロールベクター (白)、shRic-8B#2 (黒) 又は shRic-8B#3 (灰色) をコードしたレトロウィルスに感染した。細胞を 10 μ M Isoproterenol で 20 分間刺激し、cAMP 量を測定した。それぞれの値は 3 回の独立した実験からの平均値と標準偏差を示す。

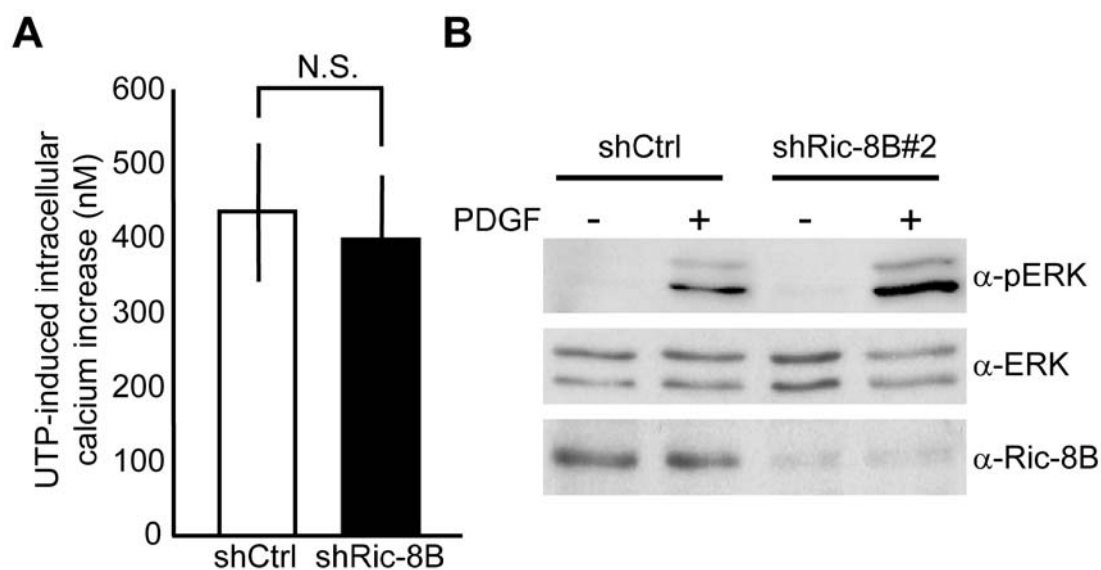


図 7 G_q シグナル及び PDGF 刺激による ERK のリン酸化に対する Ric-8B ノックダウンの効果

NIH3T3 細胞にコントロールベクター又は shRic-8B#2 をコードしたレトロウィルスを感染した。

(A) 細胞にカルシウム蛍光指示薬 Fura-2/AM を取り込ませ、10 μ M UTP で刺激し、細胞内カルシウム濃度変化をモニタリングした。刺激後の最大カルシウム濃度値から刺激直前のカルシウム濃度値を引いた値を示す。それぞれの値は 3 回の独立した実験からの平均値と標準偏差を示す。

(B) 細胞を 10 ng/ml PDGF で 15 分間刺激し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液における ERK の活性化を抗リン酸化 ERK (pERK) 抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。

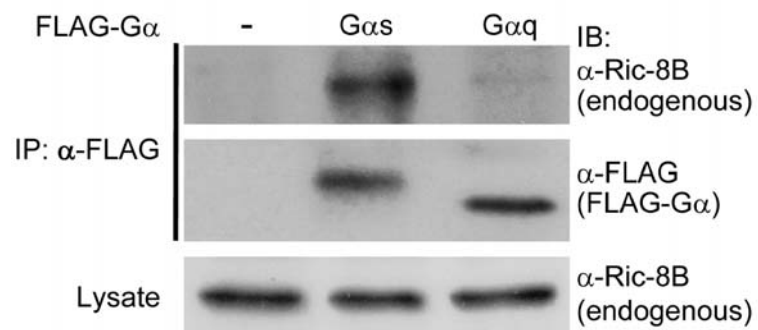


図 8 細胞内における Ric-8B と Gα_s 又は Gα_q の結合

HEK293T 細胞に FLAG-Gα_s 又は FLAG-Gα_q をトランスフェクションし、細胞抽出液を抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降に供した。共沈降した Ric-8B をウェスタンブロットにより解析した。

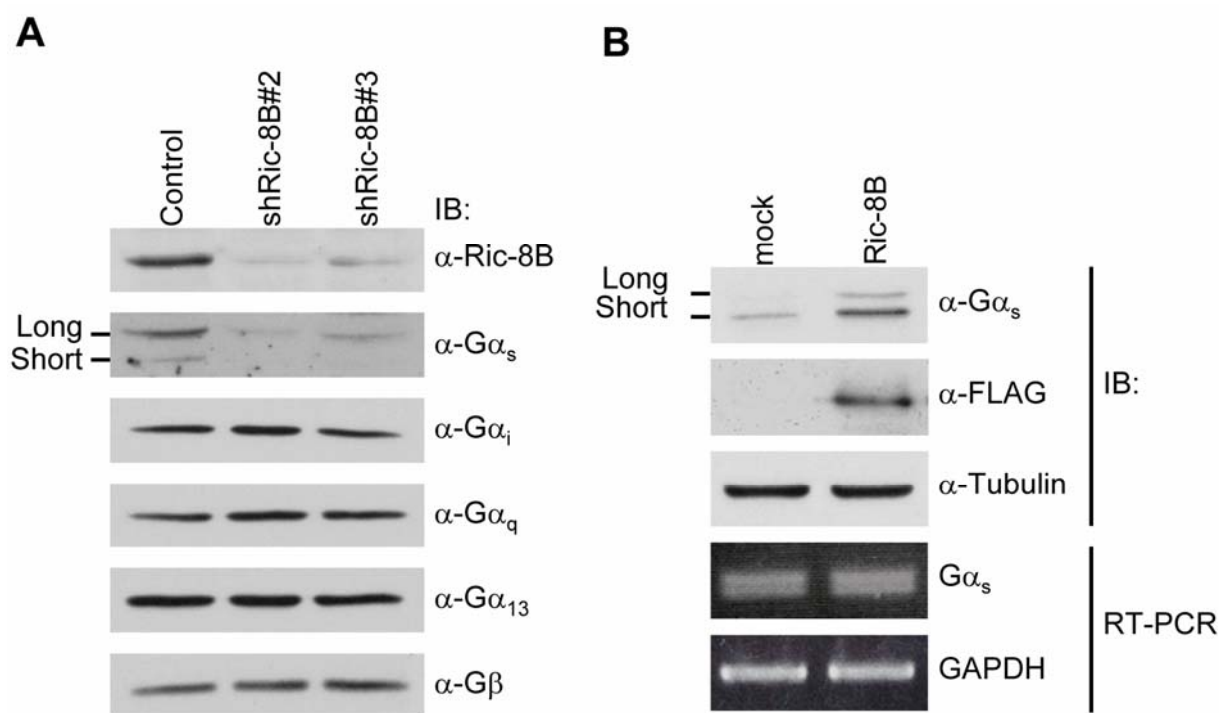


図 9 Ric-8B ノックダウン及び過剰発現による $G\alpha_s$ 蛋白質量の変動

(A) NIH3T3 細胞にコントロールベクター、shRic-8B#2 又は shRic-8B#3 をコードしたレトロウィルスを感染し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液を図に示した各種抗体を用いたウェスタンブロットに供した。 $G\alpha_s$ は long form と short form の 2 種類のスプライシングバリエントが存在し、ウェスタンブロットにより 2 つのバンドが検出される。それぞれのバリエントに対応する SDS-PAGE における移動度を図中に示した。これらのバリエントの存在比は細胞の種類によって異なる。

(B) HEK293T 細胞に FLAG-Ric-8B をトランスフェクションし、蛋白質抽出液又は全 RNA をそれぞれ調製した。蛋白質抽出液は図に示した各種抗体を用いたウェスタンブロットに、全 RNA は $G\alpha_s$ 及び GAPDH に対するプライマーを用いた RT-PCR にそれぞれ供した。

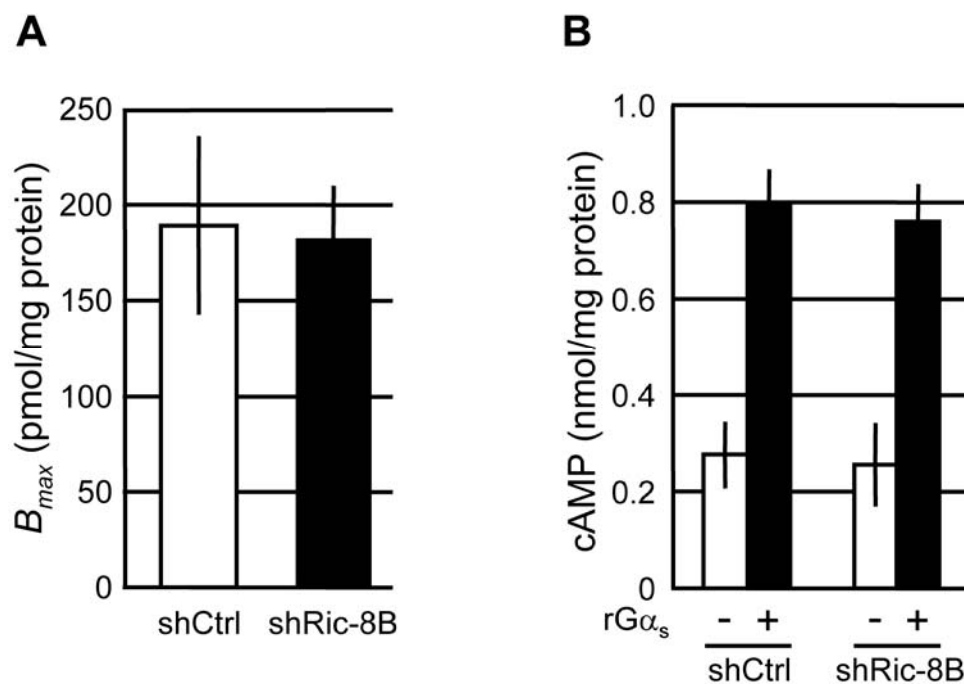


図 10 β アドレナリン受容体発現及びアデニル酸シクラーゼ活性に対する Ric-8B ノックダウンの効果

コントロールベクター又は shRic-8B#3 をコードしたレトロウィルスを感染した NIH3T3 細胞から低張緩衝液を用いて細胞抽出液を調製し、低速遠心分離により細胞核と未破碎細胞を除去した後に超遠心分離により粗膜画分を調製した。

(A) リガンド結合実験。得られた粗膜画分と [125 I]CYP を 30℃ で 60 分間インキュベーションし、反応液をガラス繊維濾紙で濾過した。濾紙に吸着した放射活性を測定した。 B_{max} 値をスキッチャード解析により算出した。それぞれの値は 5 回の独立した実験からの平均値と標準偏差を示す。

(B) 粗膜画分におけるアデニル酸シクラーゼ活性をリコンビナント $G\alpha_s$ (rGα_s) を用いた再構成実験により評価した。粗膜画分をあらかじめ GTPγS を結合して活性化させた rGα_s とインキュベーションし、その後 ATP を含む基質液を加えることにより cAMP 産生を開始した。反応液に等量の 0.1 N HCl を加えることにより酵素反応を停止した。それぞれの値は 4 回の独立した実験からの平均値と標準偏差を示す。

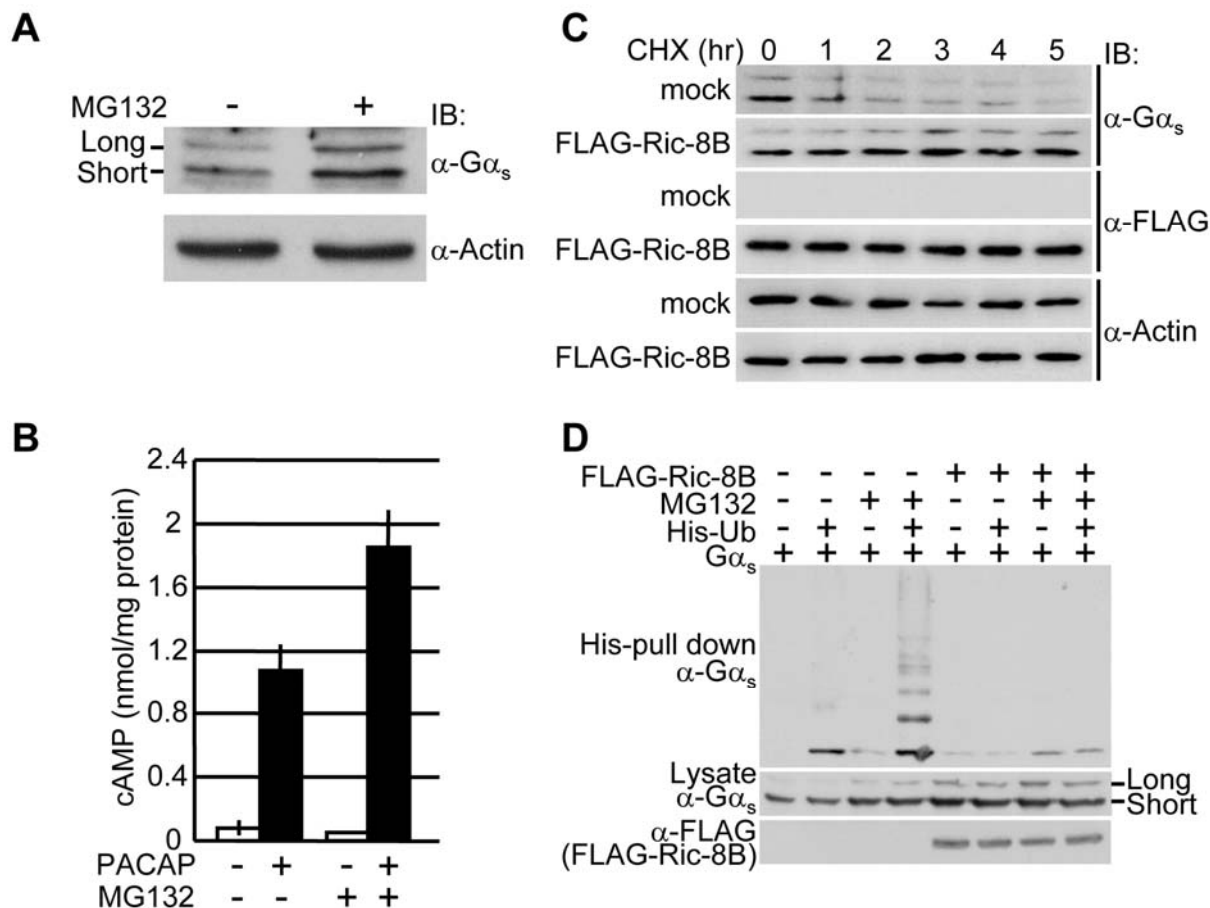


図 11 Ric-8B は Gα_s の分解とユビキチン化を抑制する

(A) HEK293T 細胞を 10 μM MG132 で 12 時間処理し、Gα_s の発現量をウェスタンブロットにより解析した。

(B) HEK293T 細胞を 10 μM MG132 で 8 時間処理した後に、10 nM PACAP で 15 分間刺激した際の細胞内 cAMP 量を測定した。

(C) FLAG-Ric-8B をトランスフェクションした HEK293T 細胞を 100 μg/ml cycloheximide (CHX) で図に示した時間処理し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液を図に示した抗体を用いたウェスタンブロットに供した。

(D) HEK293T 細胞に His-Ubiquitin (Ub)、Gα_s 及び FLAG-Ric-8B をトランスフェクションした。24 時間後、細胞を 10 μM MG132 で 12 時間処理し、8 M 尿素を含む変性条件化で細胞抽出液を調製した。Ni アガロースレジンを用いて His-ユビキチン化された蛋白質を pull down した。Gα_s のユビキチン化を抗 Gα_s 抗体を用いたウェスタンブロットにより検出した。

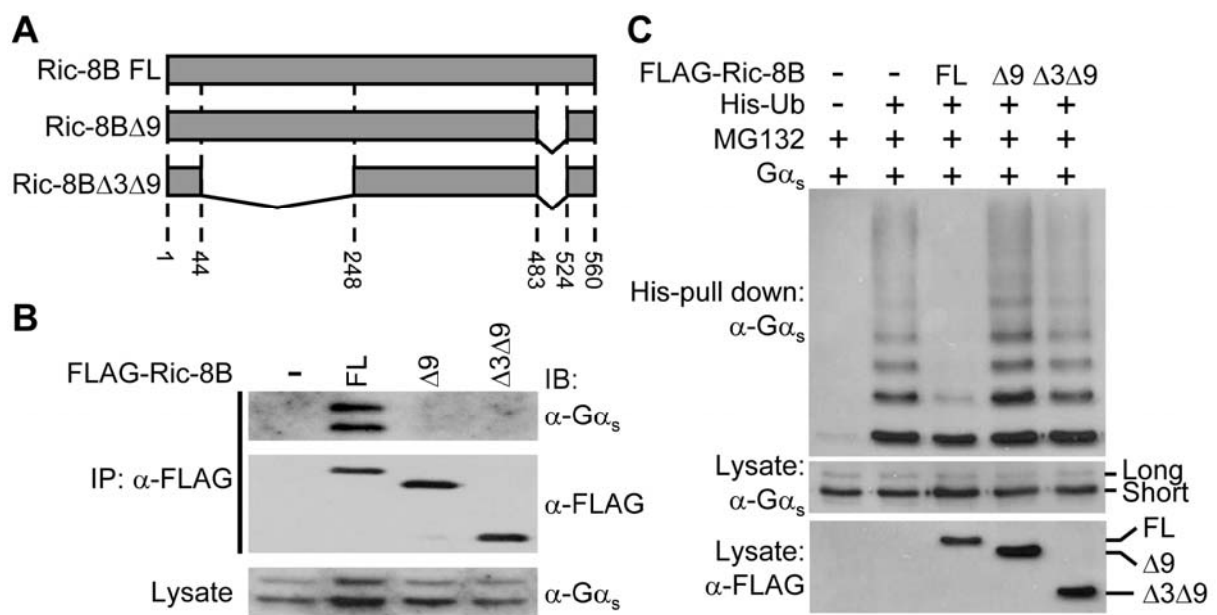


図 12 Ric-8B スプライシングバリエントの $G\alpha_s$ ユビキチン化に対する作用

(A) Ric-8B スプライシングバリエントの模式図。図中の数字は Ric-8B 全長 (FL) におけるアミノ酸番号を示している。

(B) HEK293T 細胞に FLAG-Ric-8BFL、FLAG-Ric-8BΔ9 又は FLAG-Ric-8BΔ3Δ9 をトランスフェクションし、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液を抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降に供し、共沈降した $G\alpha_s$ を抗 $G\alpha_s$ 抗体を用いたウェスタンブロットにより検出した。

(C) HEK293T 細胞に His-Ub、 $G\alpha_s$ 及び FLAG-Ric-8BFL、FLAG-Ric-8BΔ9 又は FLAG-Ric-8BΔ3Δ9 をトランスフェクションした。 $G\alpha_s$ のユビキチン化は図 11D と同じ方法を用いて検出した。

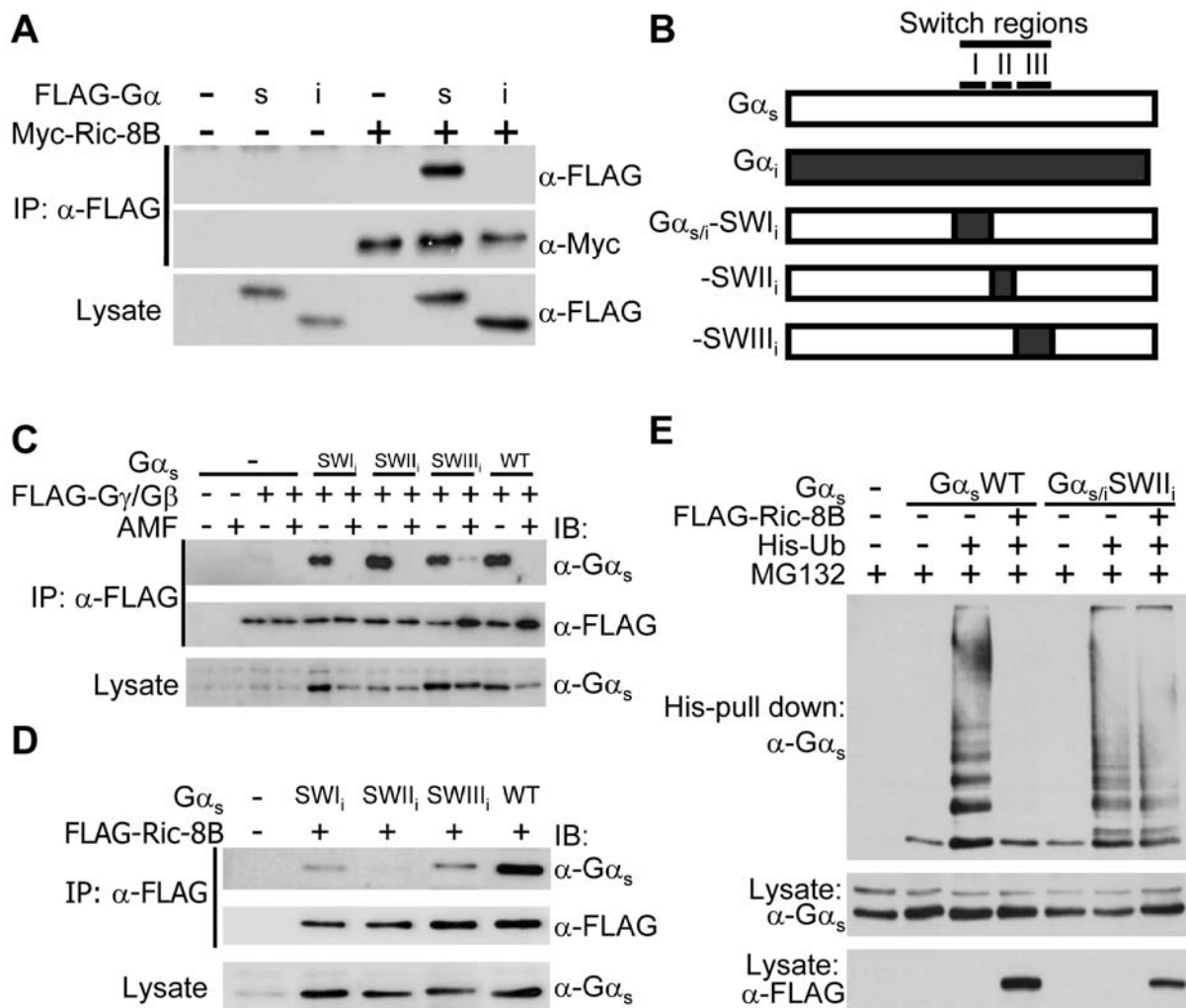


図 13 Gα_{s/i}SWI_i キメラ蛋白質の作成とそのユビキチン化に対する Ric-8B の作用

(A) HEK293T 細胞に Myc-Ric-8B と FLAG-Gα_s 又は FLAG-Gα_i をトランスフェクションし、抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降を行った。FLAG-Gα の共沈降をウェスタンブロットにより解析した。

(B) 作成した Gα_{s/i}SWI_i キメラコンストラクトの模式図。

(C) Gβ₂、FLAG-Gγ₁ 及び Gα_s WT 又は各種キメラコンストラクトをトランスフェクションした HEK293T 細胞を AlF₄⁻ (50 μM AlCl₃、10 mM MgCl₂、5 mM NaF、AMF) で 2 時間処理し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液を抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降に供し、キメラ蛋白質の共沈降を抗 Gα_s 抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。

(D) HEK293T 細胞に FLAG-Ric-8B 及び Gα_s WT 又は各種キメラコンストラクトをトランスフェクションし、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。キメラ蛋白質の共沈降を抗 Gα_s 抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。

(E) HEK293T 細胞に His-Ub、FLAG-Ric-8B 及び Gα_s WT 又は Gα_{s/i}SWI_{II} キメラコンストラクトをトランスフェクションした。Gα_s WT および Gα_{s/i}SWI_{II} キメラ蛋白質のユビキチン化は図 11D と同じ方法を用いて検出した。

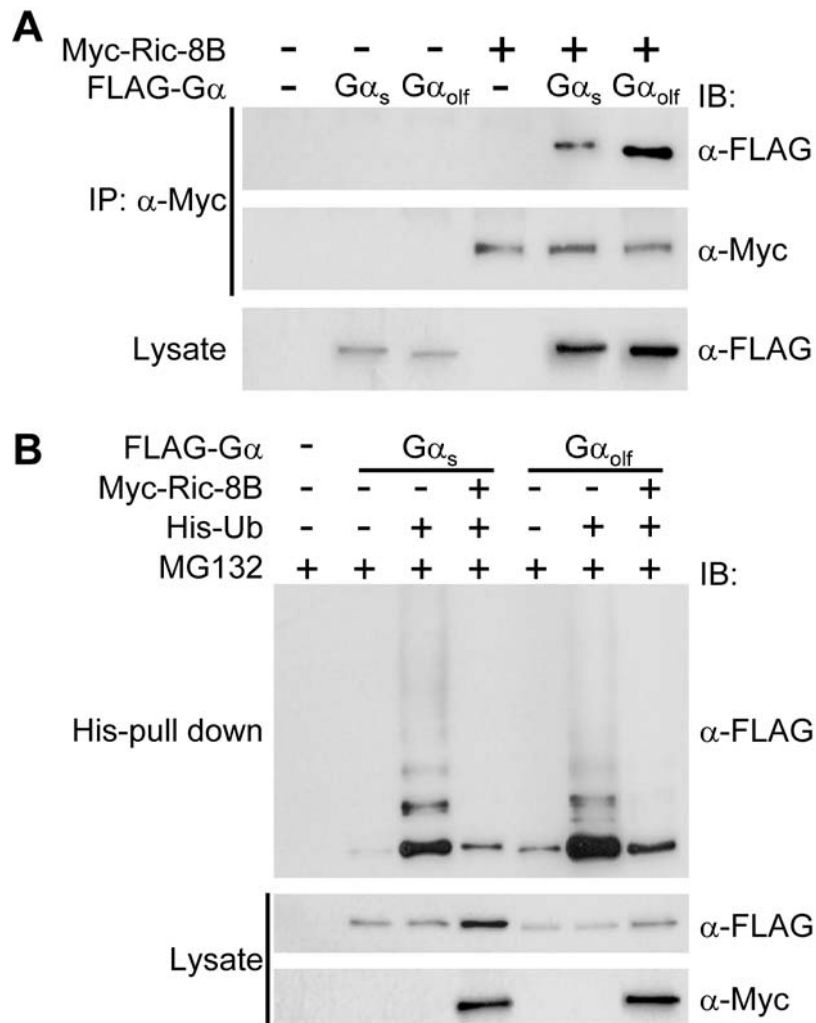


図 14 G α_{olf} のユビキチン化に対する Ric-8B の作用

(A) HEK293T 細胞に Myc-Ric-8B と FLAG-G α_s 又は FLAG-G α_{olf} をトランスフェクションし、抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降を行った。FLAG-G α の共沈降をウェスタンブロットにより解析した。

(B) HEK293T 細胞に His-Ub、Myc-Ric-8B 及び FLAG-G α_s 又は FLAG-G α_{olf} をトランスフェクションした。FLAG-G α_s および FLAG-G α_{olf} のユビキチン化は図 11D と同じ方法を用いて検出した。

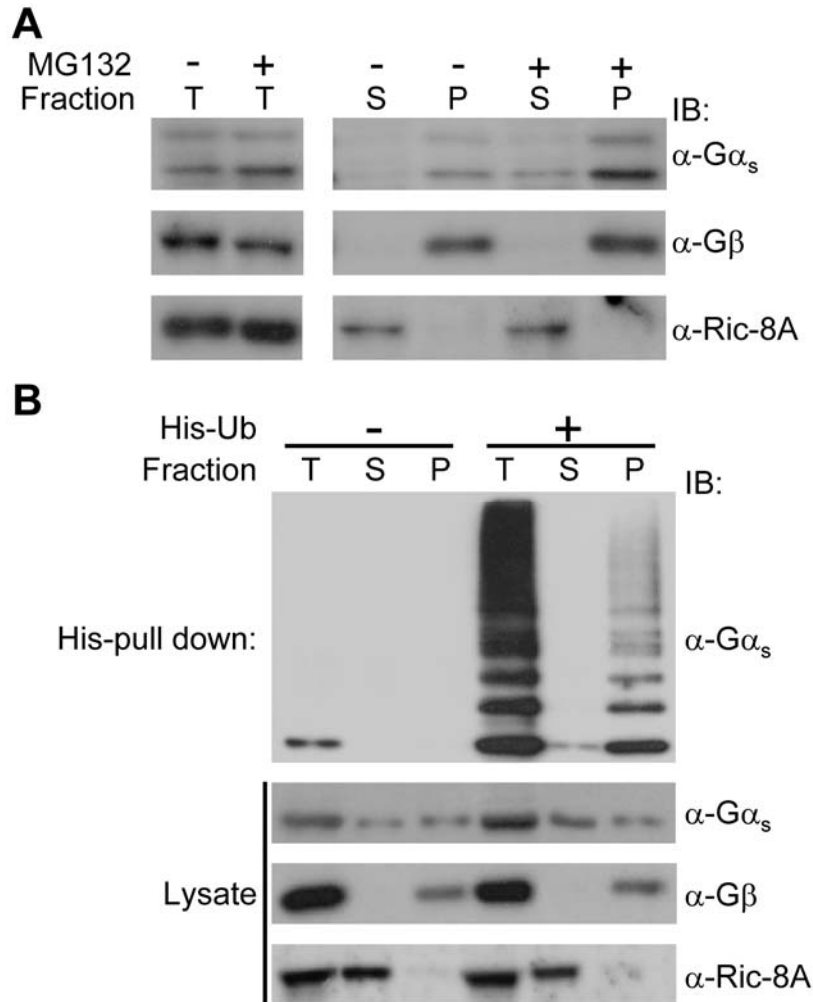


図 15 膜画分及び可溶性画分におけるユビキチン化 G α_s の局在

HEK293T 細胞から低張緩衝液を用いて細胞抽出液を調製し、低速遠心分離により細胞核と未破碎細胞を除去した後に超遠心分離により膜画分 (P) と可溶性画分 (S) を調製した。T は膜画分と可溶性画分に分画する前のサンプルを表す。G β を膜マーカー、Ric-8A を可溶性マーカーとして用いた。

(A) HEK293T 細胞を 10 μ M MG132 で 4 時間処理し、膜画分と可溶性画分を調製した。超遠心分離前のサンプルと合わせて、各画分をウェスタンブロットで解析した。

(B) HEK293T 細胞に His-Ub と G α_s をトランスフェクションし、膜画分と可溶性画分を調製した。これらの画分から図 11D と同様の方法を用いて G α_s のユビキチン化を検出した。

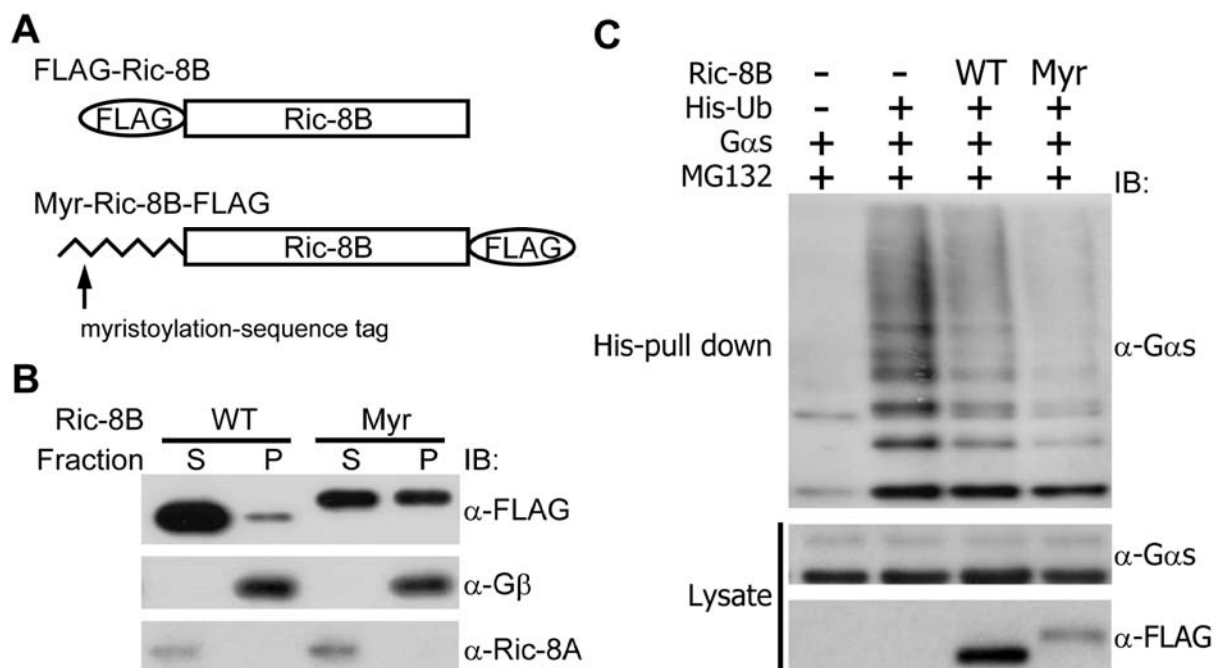


図 16 G α_s のユビキチン化に対する膜局在型 Ric-8B の効果

(A) 野生型 Ric-8B とミリストイル化配列を付加した Ric-8B (Myr-Ric-8B) の模式図。

(B) FLAG-Ric-8B 又は Myr-Ric-8B をトランスフェクションした HEK293T 細胞から低張緩衝液を用いて細胞抽出液を調製し、低速遠心分離により細胞核と未破碎細胞を除去した後に超遠心分離により膜画分 (P) と可溶性画分 (S) を調製した。G β を膜マーカー、Ric-8A を可溶性マーカーとして用いた。

(C) HEK293T 細胞に His-Ub、G α_s 及び FLAG-Ric-8B 又は Myr-Ric-8B をトランスフェクションした。G α_s のユビキチン化は図 11D と同じ方法を用いて検出した。

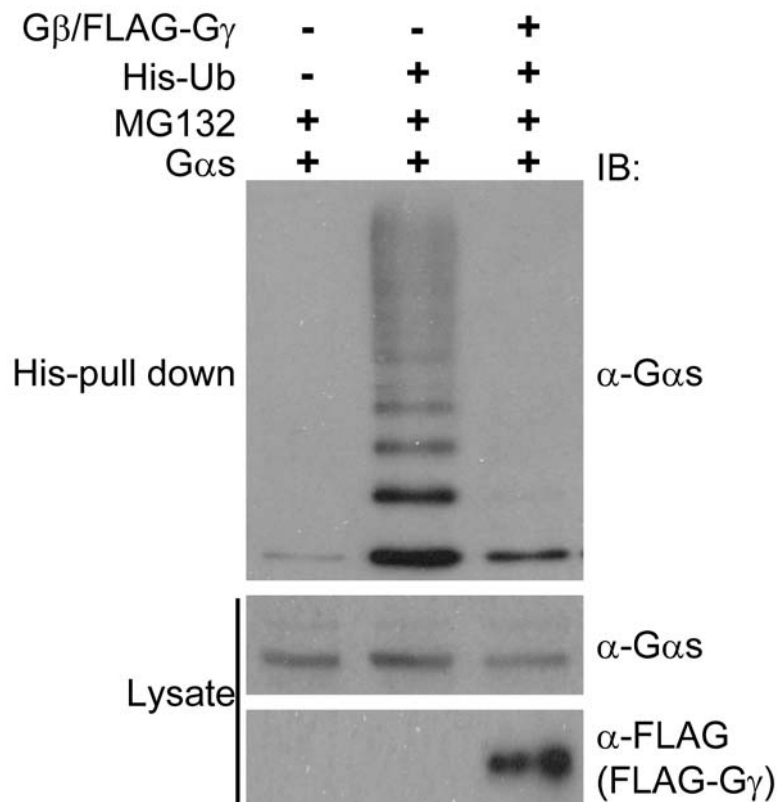


図 17 G α_s のユビキチン化に対する G $\beta\gamma$ 過剰発現の効果

HEK293T 細胞に His-Ub、G α_s 、G β_2 、及び FLAG-G γ_1 をトランスフェクションした。G α_s のユビキチン化は図 11D と同じ方法を用いて検出した。

考察

三量体 G 蛋白質による細胞内シグナル伝達はよく研究されており、数多くの生命現象に関与することが知られているが (Wettschureck and Offermanns, 2005)、G 蛋白質の活性調節機構はまだ不明な点が多い。これまでに、線虫及びショウジョウバエの RIC-8、さらに哺乳類 Ric-8A の生化学的な活性や生理的な機能が明らかにされつつある中で、同じ哺乳類における線虫 RIC-8 のホモログである Ric-8B に関してはほとんど研究が進んでいないのが現状である。本研究では、Ric-8B の生化学的及び細胞内シグナル伝達における役割の解明を目指して研究を行なった。

これまでに、哺乳類における線虫 RIC-8 のホモログである Ric-8A が $G\alpha$ に対して GEF 活性を持ち、 G_q シグナルを増強することが知られている (Nishimura et al., 2006; Tall et al., 2003)。哺乳類におけるもう一つのホモログである Ric-8B も $G\alpha$ と相互作用することが報告されており (Tall et al., 2003)、これらのことから Ric-8B も $G\alpha$ に対して GEF として機能することが推測されてきた。しかしながら、本研究では Ric-8B の $G\alpha$ に対する GEF 活性を観察することはできなかった (図 5)。一方、Ric-8B に対する shRNA を用いた解析から、Ric-8B が細胞外リガンド刺激による cAMP 産生に重要であることが示された (図 6)。これらの結果は、Ric-8B が GEF 活性とは異なる機能によって G_s シグナルを調節していることを示唆している。本研究において、Ric-8B の蛋白質量が $G\alpha_s$ の mRNA 量非依存的に $G\alpha_s$ の蛋白質量に影響を与えることを見出した (図 9)。さらに、 $G\alpha_s$ がユビキチン-プロテアソーム系の新規基質蛋白質であることを見出し、この $G\alpha_s$ のユビキチン化と分解を Ric-8B が抑制することを明らかにした (図 11)。以上の結果から、 $G\alpha_s$ の不安定性 (ユビキチン-プロテアソーム系) と安定化因子 (Ric-8B) というこれまで知られていたグアニンヌクレオチドサイクルによる G 蛋白質制御とは異なる調節系が明らかとなった。一方、Ric-8B は嗅覚系への関与が示唆されている。嗅覚系特異的 G 蛋白質である $G\alpha_{olf}$ を介した cAMP 産生が Ric-8B による増強されることが報告されているが (Von Dannecker et al., 2005)、その詳細な分子機構は明らかにされていない。 $G\alpha_{olf}$ は $G\alpha_s$ ファミリーに属しており、 $G\alpha_{olf}$ と $G\alpha_s$ はアミノ酸レベルで約 80% の相同性をもつ。本研究において、Ric-8B の過剰発現により $G\alpha_{olf}$ の蛋白質量が増加し、 $G\alpha_{olf}$ のユビキチン化が $G\alpha_s$ と同様に抑制された (図 14)。このことは G_s シグナルの場合と同様に、Ric-8B が $G\alpha_{olf}$ に対しても安定化因子として機能することにより嗅覚シグナルを維持すると推測することができる。しかしながら、Ric-8B が $G\alpha_{olf}$ に対する GEF として機能する可能性も残る。一方、

$G\alpha_s/G\alpha_{olf}$ に対する GEF 活性を示すためには細胞内因子による制御 (Ric-8B 結合蛋白質や翻訳後修飾等) が必要である可能性を否定することはできない。さらに、Ric-8B の発現やユビキチン抑制のメカニズムに関しては今後の興味ある課題として残されている。Ric-8B の分子機能を解明するために、詳細な生化学的解析や相互作用因子の探索といったアプローチが必要であろう。

本研究では、Ric-8B による $G\alpha_s$ のユビキチン化の抑制に Ric-8B と $G\alpha_s$ の結合が重要であることが強く示唆された (図 12、13)。 $G\alpha_s$ は主に細胞膜に局在するのに対して Ric-8B は細胞質に存在する蛋白質である。これまでにイソプロテレノール刺激により Ric-8B が細胞膜へトランスロケーションし、 $G\alpha_s$ と共局在することが報告されている (Klattenhoff et al., 2003)。この結果と一致するように、他のグループは Ric-8B の過剰発現により膜画分及び細胞膜近傍で $G\alpha_{olf}$ の発現量が増加することを報告している (Kerr et al., 2008; Von Dannecker et al., 2006)。また、本研究により $G\alpha_s$ のユビキチン化が細胞膜で起こり、Ric-8B の膜局在が $G\alpha_s$ のユビキチン化の抑制に重要であることが示唆された (図 15、16)。興味深いことに、恒常活性化型 $G\alpha_s$ やリガンド刺激による $G\alpha_s$ の活性化は $G\alpha_s$ 蛋白質の分解を促進することが報告されている (Chang and Bourne, 1989; Levis and Bourne, 1992)。これに加えて、 $G\alpha_s$ のユビキチン化は $G\beta\gamma$ の過剰発現により抑制されることから (図 17)、活性化することによって $G\beta\gamma$ から解離した $G\alpha_s$ は不安定であることが考えられる。これらの知見から、以下のような $G\alpha_s$ のユビキチン化と Ric-8B による抑制機構のモデルが考えられる (図 18)。 $G\alpha_s$ の活性化により $G\alpha_s$ は $G\beta\gamma$ から解離する。これにより $G\alpha_s$ は細胞膜上で不安定化、すなわちユビキチン化されプロテアソームによる分解が亢進する。一方、 $G\alpha_s$ の活性化により cAMP シグナルが活性化され、詳細な分子機構は不明だが Ric-8B が細胞膜へ移行する。Ric-8B は細胞膜上で $G\alpha_s$ と結合し、 $G\alpha_s$ のユビキチン化及びプロテアソームによる分解から保護する。このことは、Ric-8B は細胞外刺激を受けた際に $G\alpha_s$ の過度なダウンレギュレーションから保護し、 G_s シグナルを微調整するという機能を有している可能性が考えられる。しかしながら、本研究では Ric-8B の刺激依存的な膜移行をまだ確認できておらず、このモデルを検証するために今後は Ric-8B の膜移行とそのメカニズムについて検討しなければならない。さらに、Ric-8B の作用機構はほとんど明らかになっておらず、Ric-8B のリン酸化等の翻訳後修飾や結合分子の探索といった Ric-8B 自身の活性調節機構の解明が必要である。

本研究の結果から、Ric-8B による $G\alpha_s$ 蛋白質の抑制と G_s シグナルの維持

機構について推測することができる。すなわち、Ric-8B が $G\alpha_s$ のユビキチン化部位をマスクすることにより $G\alpha_s$ に対する E3 ユビキチンリガーゼのアクセスを妨げるという可能性が考えられる。 $G\alpha$ のユビキチン化部位については、酵母の $G\alpha$ である Gpa1 で唯一報告されている。この領域は哺乳類 $G\alpha$ では保存されておらず (Marotti et al., 2002)、 $G\alpha_s$ のユビキチン化部位を推定することはできない。本研究では、Ric-8B と同様に、 $G\beta\gamma$ の過剰発現によって $G\alpha_s$ のユビキチン化が抑制されることを示した (図 17)。このことは $G\alpha_s$ の $G\beta\gamma$ との結合面又はその近傍にユビキチン化部位が存在することを示唆している。これまでに明らかにされた結晶構造から、 $G\beta\gamma$ は $G\alpha$ のスイッチ領域を含む部位に結合することが知られている (Wall et al., 1995)。本研究において、 $G\alpha_s$ と $G\alpha_i$ のスイッチ領域を組み換えた $G\alpha_{s/i}$ キメラ蛋白質は野生型 $G\alpha_s$ と同様にユビキチン化された (図 13 及び未掲載データ)。興味深いことに、 $G\alpha_s$ は過剰発現させることにより細胞内でユビキチン化されるが、 $G\alpha_i$ はユビキチン化されないことから (未掲載データ)、 $G\alpha_s$ のスイッチ領域にはユビキチン化部位が存在しないことが示唆される。以上のことをまとめると、 $G\alpha_s$ のユビキチン化部位は $G\alpha_s$ の $G\beta\gamma$ との結合面近傍で且つスイッチ領域ではない領域に存在すると推測される。実際、その領域には幾つかの $G\alpha_i$ では保存されていないリシン残基が存在することから、今後これらのリシン残基に点突然変異を導入した $G\alpha_s$ 変異体を作成することにより $G\alpha_s$ のユビキチン化部位を同定することができる可能性がある。

ユビキチン化部位と同様に、 $G\alpha_s$ に対する E3 ユビキチンリガーゼは不明であるが、これまでの研究から $G\alpha_s$ に対する幾つかの E3 ユビキチンリガーゼの候補分子が考えられる。GIPN は G_i ファミリーの GAP として機能する RGS である GAIP の結合分子として同定され、RING フィンガードメインを持ち、 $G\alpha_{i3}$ のユビキチン-プロテアソーム系に依存した分解を促進することが報告されている (Fischer et al., 2003)。このことから、 $G\alpha_s$ に作用する唯一の RGS である RGS-PX (Zheng et al., 2001) の結合分子が $G\alpha_s$ に対する E3 ユビキチンリガーゼである可能性を考えることができる。また、酵母の遺伝学的解析及び生化学的解析により Rsp5 が酵母の $G\alpha$ である Gpa1 に対する E3 ユビキチンリガーゼとして機能することが報告されている (Torres et al., 2009)。Rsp5 による Gpa1 のユビキチン化部位は哺乳類 $G\alpha$ では保存されていない (Marotti et al., 2002)。しかしながら、Rsp5 の哺乳類におけるホモログである NEDD4 ファミリーが $G\alpha_s$ に対する E3 ユビキチンリガーゼの候補として考えることは可能である。さらに最近、Mahogunin Ring Finger-1 (MGRN1) がメラノコルチン受容体を介した cAMP 産生を抑制することが報告された (Perez-Oliva et al., 2009)。この作用機序としては $G\alpha_s$ とメラノコルチン受容体の結合に対して MGRN1 が競合するというモデル

が推測されている。MGRN1 は RING フィンガードドメインを有しており、E3 ユビキチンリガーゼ活性を示すことが報告されているが(He et al., 2003; Kim et al., 2007)、 $G\alpha_s$ に対する活性を測定した報告はない。MGRN1 が $G\alpha_s$ に対する E3 ユビキチンリガーゼ活性を示すかどうかは非常に興味深い。Ric-8B による $G\alpha_s$ ユビキチン化抑制のさらなる解明のために、 $G\alpha_s$ のユビキチン化部位及び $G\alpha_s$ に対する E3 ユビキチンリガーゼの同定は不可欠であり、今後の重要な検討課題である。

Ric-8 は無脊椎動物では 1 種類しか存在しないのに対し、脊椎動物には 2 種類の Ric-8、Ric-8A と Ric-8B が存在する。無脊椎動物における Ric-8 ファミリーの生理的役割は線虫やショウジョウバエにおける遺伝学的解析から明らかにされており、Ric-8 は線虫の初期胚(Afshar et al., 2004; Miller and Rand, 2000)及びショウジョウバエの神経芽細胞(David et al., 2005; Hampoelz et al., 2005; Wang et al., 2005a)において細胞の非対称分裂に関わる。非対称分裂には G_i ファミリーの G 蛋白質の活性が必要であり、 $G\alpha$ は古典的な $G\alpha\beta\gamma$ の三量体ではなく、GoLoco モチーフという $G\alpha$ の GDP 結合を安定化する活性を持つ蛋白質（線虫では GPR1/2、ショウジョウバエでは Pins）と複合体を形成する(Siderovski and Willard, 2005)。Ric-8 は GPCR 非依存的 GEF として機能することにより G 蛋白質の活性を調節し、非対称分裂における星状体微小管の引っ張り力を調節するというモデルが提唱されている(Wilkie and Kinch, 2005)。また、細胞の非対称分裂中において、*Ric-8* 変異体では $G\alpha_i$ 又は $G\alpha_o$ の発現量が減少していることが観察されているが(Afshar et al., 2005; Hampoelz et al., 2005)、その詳細な作用機序は明らかにされていない。一方、哺乳類 Ric-8A は $G\alpha_i$ /LGN (GPR1/2 及び Pins の哺乳類におけるホモログ)/NuMA 複合体における $G\alpha_i$ に対して GEF 活性を示し、星状体における微小管の pulling force の形成に関与する蛋白質である NuMA をこの複合体から放出させる(Tall and Gilman, 2005)。NuMA の微小管への結合は LGN からの解離が必要であることから(Du et al., 2002)、Ric-8A は細胞分裂における染色体の pulling force の形成に関与している事が示唆されている(Tall and Gilman, 2005)。これらの知見は Ric-8 の機能が線虫から哺乳類まで高く保存されている事を表している。これらの知見と本研究の結果を合わせて考えると、Ric-8 ファミリーの分子進化における仮説を提唱することが可能である。無脊椎動物 Ric-8 は $G\alpha$ に対する GEF 活性及び安定化の両方の機能を持つ多機能蛋白質である。これらの分子機能は進化の過程で分岐し、哺乳類では $G\alpha$ に対する GEF 活性を Ric-8A に、安定化の機能を Ric-8B に受け継がれた可能性が考えられる。生理的機能においても Ric-8A と Ric-8B では機能が異なることが推測される。Ric-8A のノックア

ウトマウスは原腸胚形成不全により胚性致死となることが観察されているが(Tonissou et al., 2006)、ショウジョウバエにおいても *Ric-8* 変異体では非対称分裂の異常と共に原腸陥入の異常が観察されている(Hampoelz et al., 2005)。このことは *Ric-8A* は無脊椎動物で観察された生理的機能をよく保存していることを示している。一方、*Ric-8B* のノックアウトマウスを用いた解析はまだ報告されていないが、ゼブラフィッシュの遺伝学的解析から G_s シグナルを調節することが示唆されており(Nagayoshi et al., 2008)、このことから *Ric-8B* は G_s シグナルに特化して進化したと推測することができる。*Ric-8A* ノックアウトマウスとゼブラフィッシュの *Ric-8B* 変異体の表現系から、*Ric-8A* と *Ric-8B* は一方の遺伝子の欠損を互いに相補することは無く、生体内では異なる機能を持つことが推測される。これらは仮説の段階であり、*Ric-8* ファミリーのさらなる解析、特に遺伝学的アプローチを用いることにより *Ric-8* ファミリーの生理的機能とその分子機構の詳細が明らかになることが期待される。

G 蛋白質の $G\alpha$ に結合したグアニンヌクレオチドの違いによる活性制御は G 蛋白質シグナルの中心的概念としてよく知られている。一方で、G 蛋白質の翻訳後の安定性や発現量の制御機構はほとんど知見が得られていなかった。本研究ではこれまでに予想されていた機能とは全く異なる *Ric-8B* の機能と G 蛋白質シグナル調節機構を明らかにした。G 蛋白質のユビキチン-プロテアソーム系による分解と *Ric-8B* による安定化の機構は、G 蛋白質の質的制御（グアニンヌクレオチドサイクル）に加えて量的制御もまた適切な G 蛋白質シグナルに必須であることを明確に示しており、新たな G 蛋白質調節機構を提唱している。

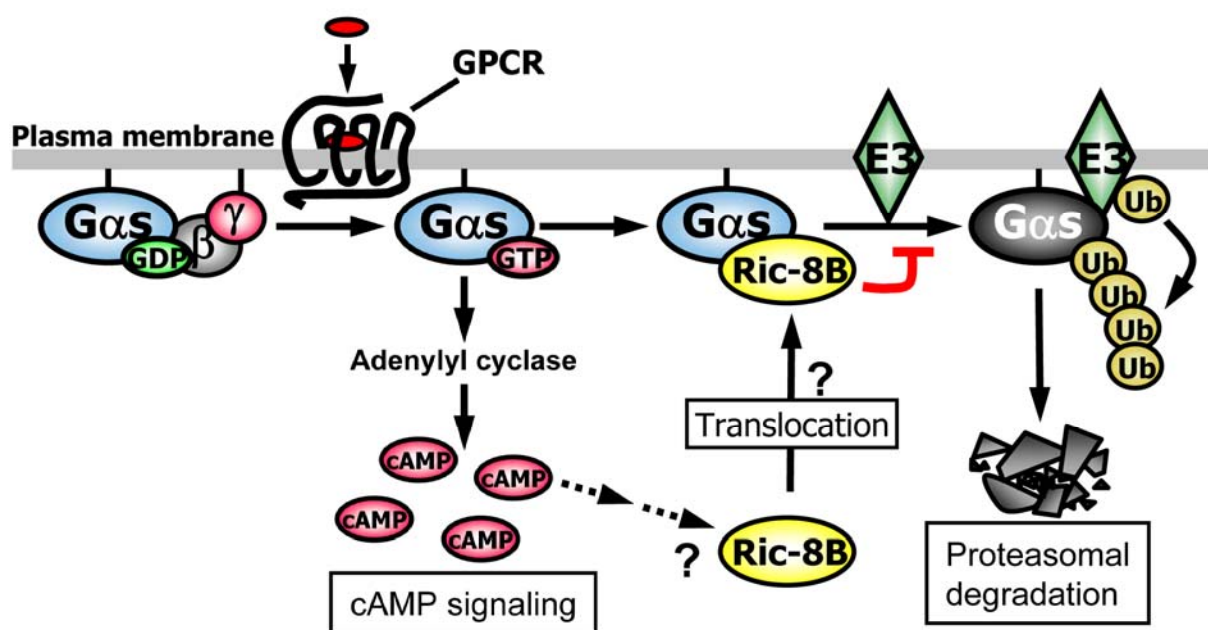


図 18 Gα_s のユビキチン化と Ric-8B による阻害のモデル
モデルの説明は本文中に示した。

謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞内情報学講座の伊東広教授の御指導の下で行われました。

伊東広教授は数多くの的確な御助言で本研究を常に適切な方向へ導いてくださいました。また、研究の技術だけでなく研究に対する姿勢、考え方及び心構えといったこれからの研究生活において非常に重要な要素を 5 年間に亘って暖かく指導していただきました。心から感謝と御礼を申し上げます。

稲垣直之准教授には数多くの異なる視点からの有益な御助言を賜りました。水野憲一助教には日々の研究における多くの御助言と御指導を賜りました。多胡憲治助教には日々の研究の御指導に加えて研究に対するモチベーションを維持するための絶えまない激励を頂きました。西村明幸博士には私が細胞内情報学講座に配属された時から現在に至るまで、実験の御指導と有益なディスカッションをしていただきました。同期である青木千尋さん、川端早苗さん、林充耶君、深見岳史君の存在は常に励みとなり、共に切磋琢磨した大学院生活はかけがえのないものとなりました。細胞内情報学講座の皆様のおかげでスムーズに研究を遂行することができ、充実した 5 年間を送ることができました。以上の細胞内情報学講座の皆様に心からの感謝と御礼を申し上げます。

イリノイ大学シカゴ校の小笹徹博士には $G\alpha_q$ 、 $G\beta_1$ 、His- $G\gamma_2$ 発現バキュロウイルスを、愛知県心身障害者コロニーの浅野富子博士には抗 $G\alpha_i$ 抗体を、ロチェスター大学の Dirk Bohman 博士にはユビキチン発現プラスミドを提供して頂きました。これらの先生方に厚く感謝と御礼申し上げます。

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科の塩坂貞夫教授、川市正史教授、加藤順也教授にはアドバイザー委員として 5 年間に亘って適切な御助言を賜り、本研究を常に正しい方向へと導いてくださいました。厚く感謝と御礼申し上げます。

最後に、この 5 年間を含む学生生活を送るにあたって家族の多大な支援と寛大な理解が不可欠でした。これまでの学生期間を暖かく見守り、支えて下さった家族に心から感謝申し上げます。

2010 年 1 月 25 日 永井裕介

参考文献

- Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Johnston, C.A., McCudden, C.R., Siderovski, D.P., and Gonczy, P. (2004). RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent $G\alpha$ function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell* *119*, 219-230.
- Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Siderovski, D.P., and Gonczy, P. (2005). Cortical localization of the $G\alpha$ protein GPA-16 requires RIC-8 function during *C. elegans* asymmetric cell division. *Development* *132*, 4449-4459.
- Chang, F.H., and Bourne, H.R. (1989). Cholera toxin induces cAMP-independent degradation of G_s . *J. Biol. Chem.* *264*, 5352-5357.
- Chen, C.A., and Manning, D.R. (2001). Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* *20*, 1643-1652.
- David, N.B., Martin, C.A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., and Bellaiche, Y. (2005). *Drosophila* Ric-8 regulates $G\alpha_i$ cortical localization to promote $G\alpha_i$ -dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* *7*, 1083-1090.
- Du, Q., Taylor, L., Compton, D.A., and Macara, I.G. (2002). LGN blocks the ability of NuMA to bind and stabilize microtubules. A mechanism for mitotic spindle assembly regulation. *Curr. Biol.* *12*, 1928-1933.
- Fischer, T., De Vries, L., Meerloo, T., and Farquhar, M.G. (2003). Promotion of $G\alpha_{i3}$ subunit down-regulation by GIPN, a putative E3 ubiquitin ligase that interacts with RGS-GAIP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8270-8275.
- Gilman, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* *56*, 615-649.

- Graziano, M.P., Freissmuth, M., and Gilman, A.G. (1989). Expression of $G_s\alpha$ in *Escherichia coli*. Purification and properties of two forms of the protein. J. Biol. Chem. *264*, 409-418.
- Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S.K., Dunican, D., and Knoblich, J.A. (2005). *Drosophila* Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. Nat. Cell Biol. *7*, 1099-1105.
- He, L., Lu, X.Y., Jolly, A.F., Eldridge, A.G., Watson, S.J., Jackson, P.K., Barsh, G.S., and Gunn, T.M. (2003). Spongiform degeneration in mahoganoid mutant mice. Science *299*, 710-712.
- Huang, C., Duncan, J.A., Gilman, A.G., and Mumby, S.M. (1999). Persistent membrane association of activated and depalmitoylated G protein α subunits. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 412-417.
- Iiri, T., Backlund, P.S., Jr, Jones, T.L., Wedegaertner, P.B., and Bourne, H.R. (1996). Reciprocal regulation of $G_s\alpha$ by palmitate and the $\beta\gamma$ subunit. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 14592-14597.
- Itoh, H., and Gilman, A.G. (1991). Expression and analysis of $G_s\alpha$ mutants with decreased ability to activate adenylyl cyclase. J. Biol. Chem. *266*, 16226-16231.
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., and Satoh, T. (1991). Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. Annu. Rev. Biochem. *60*, 349-400.
- Kerr, D.S., Von Dannecker, L.E., Davalos, M., Michaloski, J.S., and Malnic, B. (2008). Ric-8B interacts with $G\alpha_{olf}$ and $G\gamma_{13}$ and co-localizes with $G\alpha_{olf}$, $G\beta_1$ and $G\gamma_{13}$ in the cilia of olfactory sensory neurons. Mol. Cell. Neurosci. *38*, 341-348.
- Kim, B.Y., Olzmann, J.A., Barsh, G.S., Chin, L.S., and Li, L. (2007). Spongiform neurodegeneration-associated E3 ligase Mahogunin ubiquitylates TSG101 and regulates endosomal trafficking. Mol. Biol. Cell *18*, 1129-1142.

Klattenhoff, C., Montecino, M., Soto, X., Guzman, L., Romo, X., Garcia, M.A., Mellstrom, B., Naranjo, J.R., Hinrichs, M.V., and Olate, J. (2003). Human brain synembryn interacts with $G_s\alpha$ and $G_q\alpha$ and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol. *J. Cell. Physiol.* *195*, 151-157.

Kleuss, C., and Krause, E. (2003). $G\alpha_s$ is palmitoylated at the N-terminal glycine. *EMBO J.* *22*, 826-832.

Kozasa, T. (2004). Purification of G protein subunits from *Sf9* insect cells using hexahistidine-tagged α and $\beta\gamma$ subunits. *Methods Mol. Biol.* *237*, 21-38.

Kuo, M.L., den Besten, W., Bertwistle, D., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (2004). N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes Dev.* *18*, 1862-1874.

Levis, M.J., and Bourne, H.R. (1992). Activation of the α subunit of G_s in intact cells alters its abundance, rate of degradation, and membrane avidity. *J. Cell Biol.* *119*, 1297-1307.

Madura, K., and Varshavsky, A. (1994). Degradation of $G\alpha$ by the N-end rule pathway. *Science* *265*, 1454-1458.

Marotti, L.A., Jr, Newitt, R., Wang, Y., Aebersold, R., and Dohlman, H.G. (2002). Direct identification of a G protein ubiquitination site by mass spectrometry. *Biochemistry* *41*, 5067-5074.

Miller, K.G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J.A., Johnson, C.D., and Rand, J.B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 12593-12598.

Miller, K.G., Emerson, M.D., McManus, J.R., and Rand, J.B. (2000). RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for $G_q\alpha$ signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron* *27*, 289-299.

Miller, K.G., and Rand, J.B. (2000). A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 ($G_o\alpha$) in regulating a subset of centrosome movements during

early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *156*, 1649-1660.

Mumby, S.M. (1997). Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 148-154.

Nagayoshi, S., Hayashi, E., Abe, G., Osato, N., Asakawa, K., Urasaki, A., Horikawa, K., Ikeo, K., Takeda, H., and Kawakami, K. (2008). Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn-like*. *Development* *135*, 159-169.

Nishimura, A., Okamoto, M., Sugawara, Y., Mizuno, N., Yamauchi, J., and Itoh, H. (2006). Ric-8A potentiates Gq-mediated signal transduction by acting downstream of G protein-coupled receptor in intact cells. *Genes Cells* *11*, 487-498.

Perez-Oliva, A.B., Olivares, C., Jimenez-Cervantes, C., and Garcia-Borron, J.C. (2009). Mahogunin ring finger-1 (MGRN1) E3 ubiquitin ligase inhibits signaling from melanocortin receptor by competition with $G\alpha_s$. *J. Biol. Chem.* *284*, 31714-31725.

Siderovski, D.P., and Willard, F.S. (2005). The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein α subunits. *Int. J. Biol. Sci.* *1*, 51-66.

Tall, G.G., and Gilman, A.G. (2005). Resistance to inhibitors of cholinesterase 8A catalyzes release of $G\alpha_i$ -GTP and nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) from NuMA/LGN/ $G\alpha_i$ -GDP complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16584-16589.

Tall, G.G., Krumins, A.M., and Gilman, A.G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric $G\alpha$ protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* *278*, 8356-8362.

Tonissoo, T., Koks, S., Meier, R., Raud, S., Plaas, M., Vasar, E., and Karis, A. (2006). Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. *Behav. Brain Res.* *167*, 42-48.

- Torres, M.P., Lee, M.J., Ding, F., Purbeck, C., Kuhlman, B., Dokholyan, N.V., and Dohlman, H.G. (2009). G Protein Mono-ubiquitination by the Rsp5 Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.* *284*, 8940-8950.
- Treier, M., Staszewski, L.M., and Bohmann, D. (1994). Ubiquitin-dependent c-Jun degradation *in vivo* is mediated by the δ domain. *Cell* *78*, 787-798.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 1015-1068.
- Von Dannecker, L.E., Mercadante, A.F., and Malnic, B. (2006). Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 9310-9314.
- Von Dannecker, L.E., Mercadante, A.F., and Malnic, B. (2005). Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein $G\alpha_{olf}$. *J. Neurosci.* *25*, 3793-3800.
- Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer $G_{i\alpha_1\beta_1\gamma_2}$. *Cell* *83*, 1047-1058.
- Wang, H., Ng, K.H., Qian, H., Siderovski, D.P., Chia, W., and Yu, F. (2005a). Ric-8 controls *Drosophila* neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nat. Cell Biol.* *7*, 1091-1098.
- Wang, Y., Marotti, L.A., Jr, Lee, M.J., and Dohlman, H.G. (2005b). Differential regulation of G protein α subunit trafficking by mono- and polyubiquitination. *J. Biol. Chem.* *280*, 284-291.
- Wedegaertner, P.B., and Bourne, H.R. (1994). Activation and depalmitoylation of $G_s\alpha$. *Cell* *77*, 1063-1070.
- Wedegaertner, P.B., Chu, D.H., Wilson, P.T., Levis, M.J., and Bourne, H.R. (1993). Palmitoylation is required for signaling functions and membrane attachment of $G_q\alpha$ and $G_s\alpha$. *J. Biol. Chem.* *268*, 25001-25008.

Weissman, A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 169-178.

Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* *85*, 1159-1204.

Wilkie, T.M., and Kinch, L. (2005). New roles for $G\alpha$ and RGS proteins: communication continues despite pulling sisters apart. *Curr. Biol.* *15*, R843-54.

Zheng, B., Ma, Y.C., Ostrom, R.S., Lavoie, C., Gill, G.N., Insel, P.A., Huang, X.Y., and Farquhar, M.G. (2001). RGS-PX1, a GAP for $G\alpha_s$ and sorting nexin in vesicular trafficking. *Science* *294*, 1939-1942.