

## 三量体 G タンパク質シグナル制御機構の新たな展開

伊 東 広<sup>1</sup>, 西村明幸<sup>1,2</sup>, 永井裕介<sup>1,3</sup>

ホルモン、神経伝達物質、光、匂い、味物質など数多くの細胞外情報は G タンパク質共役受容体により認識された後、 $\alpha\beta\gamma$ の三つのサブユニットからなる三量体 G タンパク質を活性化して細胞応答を引き起こす。受容体と G タンパク質からなる複合体の X 線結晶構造解析、G タンパク質を特異的に阻害する分子の同定と作用機構の解明などにおいて近年著しい進展が見られた。また非受容体型 G タンパク質制御候補因子として線虫の遺伝学的解析から見いだされた Ric-8 が G タンパク質に対するグアニンヌクレオチド交換反応促進活性を示すとともに、細胞内において G タンパク質のユビキチン化の調節因子、分子シャペロンとして働くことも明らかとなってきた。これらの新たに見えてきた G タンパク質シグナル制御メカニズムを概説し、生体調節との関わりおよび創薬へ向けた新たな展開を紹介する。

### 1. はじめに

$\alpha\beta\gamma$ の三つのサブユニットからなる三量体 G タンパク質はホルモン、神経伝達物質、光、匂い、味物質など数多くの細胞外情報を認識した G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor : GPCR) により活性化され、遺伝子発現、ホルモン分泌、神経伝達物質の放出、細胞遊走など様々な細胞応答に関与する。GDP と GTP の結合状態により可逆的に生体高分子との相互作用を変化させ、生体のシグナル伝達機構において分子スイッチとして働く GTP 結合タンパク質の一つとしてもよく知られている<sup>1)</sup>。近年、GPCR との結合により大きく構造変化が誘導され GDP や GTP が解離している時の G タンパク質  $\alpha$  サブユニット ( $G\alpha$ ) の構造が解き明かされた<sup>2)</sup>。一方、その構造変化を阻害する新たな G タンパク質阻害剤の作用機構も判明し

た<sup>3)</sup>。さらに G タンパク質の活性を調節する分子として従来知られている GPCR<sup>4)</sup> や RGS (regulator of G protein signaling)<sup>5)</sup> とは別の G タンパク質制御分子 Ric-8 (resistance to inhibitor of cholinesterase) の働きも解き明かされた<sup>6,7)</sup>。本稿では、最初に G タンパク質を制御する分子を概説し、後半では Ric-8 に関する研究を紹介する。

### 2. G タンパク質の構造

$G\alpha$  サブユニットは Ras-like GTPase ドメインと Helical ドメインから構成されている (図 1A)。GTPase ドメインはその名の通り低分子量 GTPase である Ras と構造が類似した領域であり、全ての GTP 結合タンパク質に共通して見られる五つの G モチーフ ( $G1\sim G5$ ) を介してグアニンヌクレオチド (GDP/GTP) と結合している。一方、Helical ドメインは他の GTP 結合タンパク質には見られない  $G\alpha$  特有のドメインであるがその機能はあまり詳しくわかっていない。Helical ドメインは GTPase ドメインの途中に挿入されていることから、この両ドメインは 2 本のリンカー領域 (リンカー 1 とリンカー 2) を介してつながっている。また GTPase ドメイン内には GDP 結合時と GTP 結合時とでコンホメーションが変化する三つのスイッチ領域があり、エフェクターやレギュレーターとの相互作用領域となっている<sup>8)</sup>。 $G\beta$  サブユニットは七つの WD40 リピートからなる  $\beta$ -プロペラ構造を持ち、 $G\gamma$  サブユニットがその

<sup>1</sup> 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科分子情報薬理学研究室 (〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5)

(現所属：<sup>2</sup> コーネル大学、<sup>3</sup> 島津ジーエルシー)

New research initiatives in the regulatory mechanisms of heterotrimeric G protein signaling

Hiroshi Itoh, Akiyuki Nishimura and Yusuke Nagai (Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-0192, Japan)

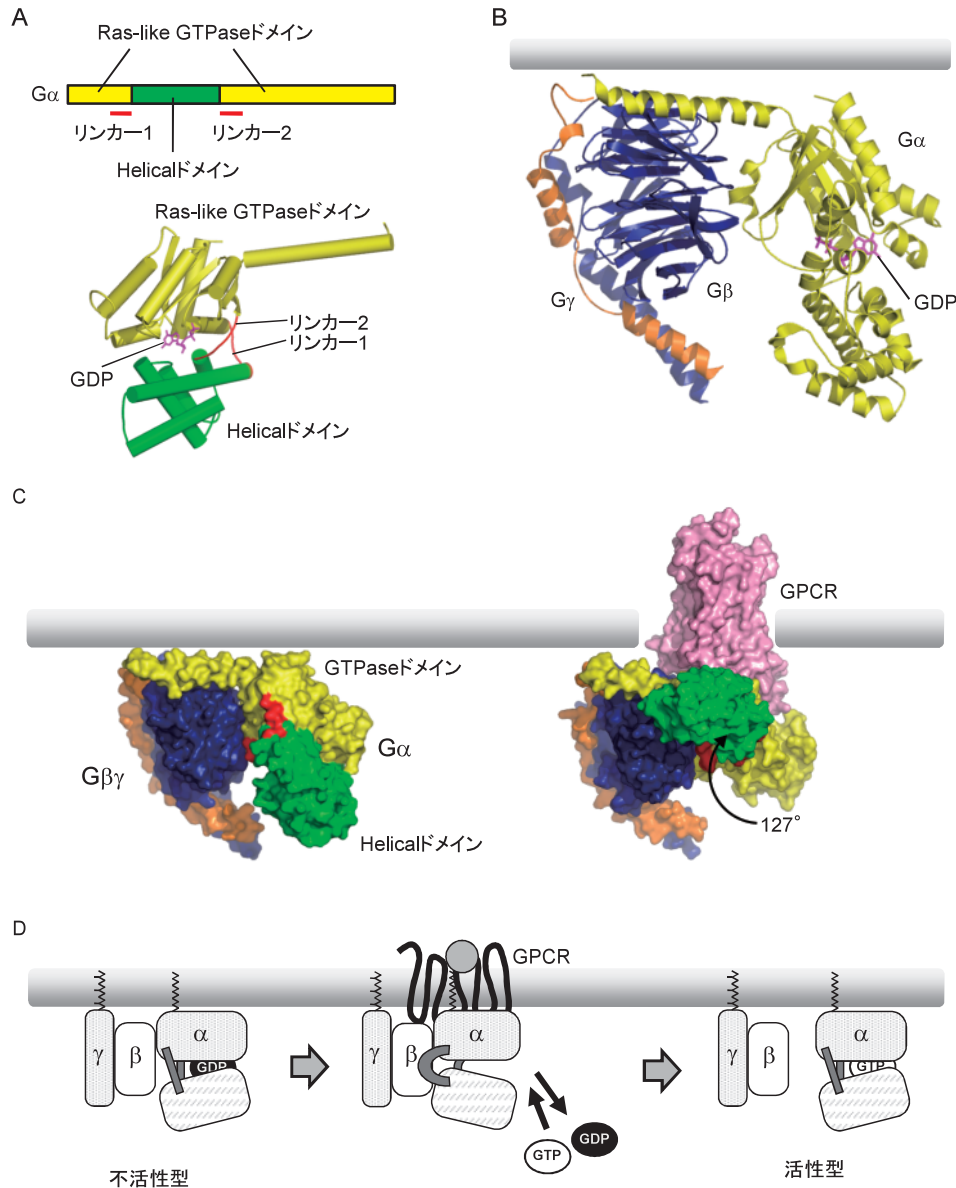


図1 三量体Gタンパク質の構造と活性化

(A) Gαの一次構造と立体構造。GαはRas-like GTPaseドメインとHelicalドメイン、さらに両ドメインをつなぐ2本のリンカー領域から構成されている。GTPaseドメインに結合しているGDPもしくはGTPは通常Helicalドメインによりマスクされている。(B) 三量体Gαβγの立体構造(PDB番号:1GP2)。(C) 三量体Gαβγ(PDB番号:1GP2)とβアドレナリン受容体-三量体Gαβγ複合体(PDB番号:3SN6)の構造比較。βアドレナリン受容体との複合体ではGαからヌクレオチドが解離しており、リンカー部分を支点にHelicalドメインが127°シフトしている。この構造変化によりGαのグアニンヌクレオチド結合部位が外部に露出していることがわかる。(D) 活性化時におけるGタンパク質の構造変化のモデル図。

プロペラ構造の外側とN末端部分のコイルドコイル領域で結合している。そのためGβγ複合体は非常に安定であり生理的条件下では両者は解離しないと考えられている(図1B)。

次にGタンパク質活性化に関する構造的知見に関して記述する。通常、Gαに結合しているグアニンヌクレオチドはGTPaseドメインとHelicalドメインに完全に覆われた状態にあることから、GDP解離時にはGDPが外部に露出するような大きな構造変化がGαに起こると予想されて

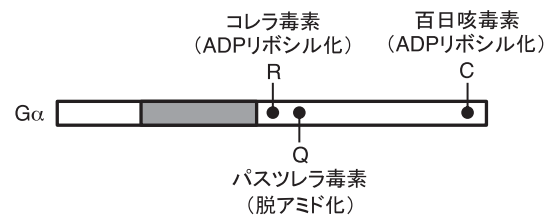


図2 Gαの細菌毒素修飾部位

コレラ毒素、百日咳毒素、パストツレラ毒素により修飾されるGαのアルギニン(R)、システイン(C)、グルタミン(Q)残基をそれぞれ示す。灰色部分はHelicalドメイン、白色部分はGTPaseドメインを示す(図1参照)

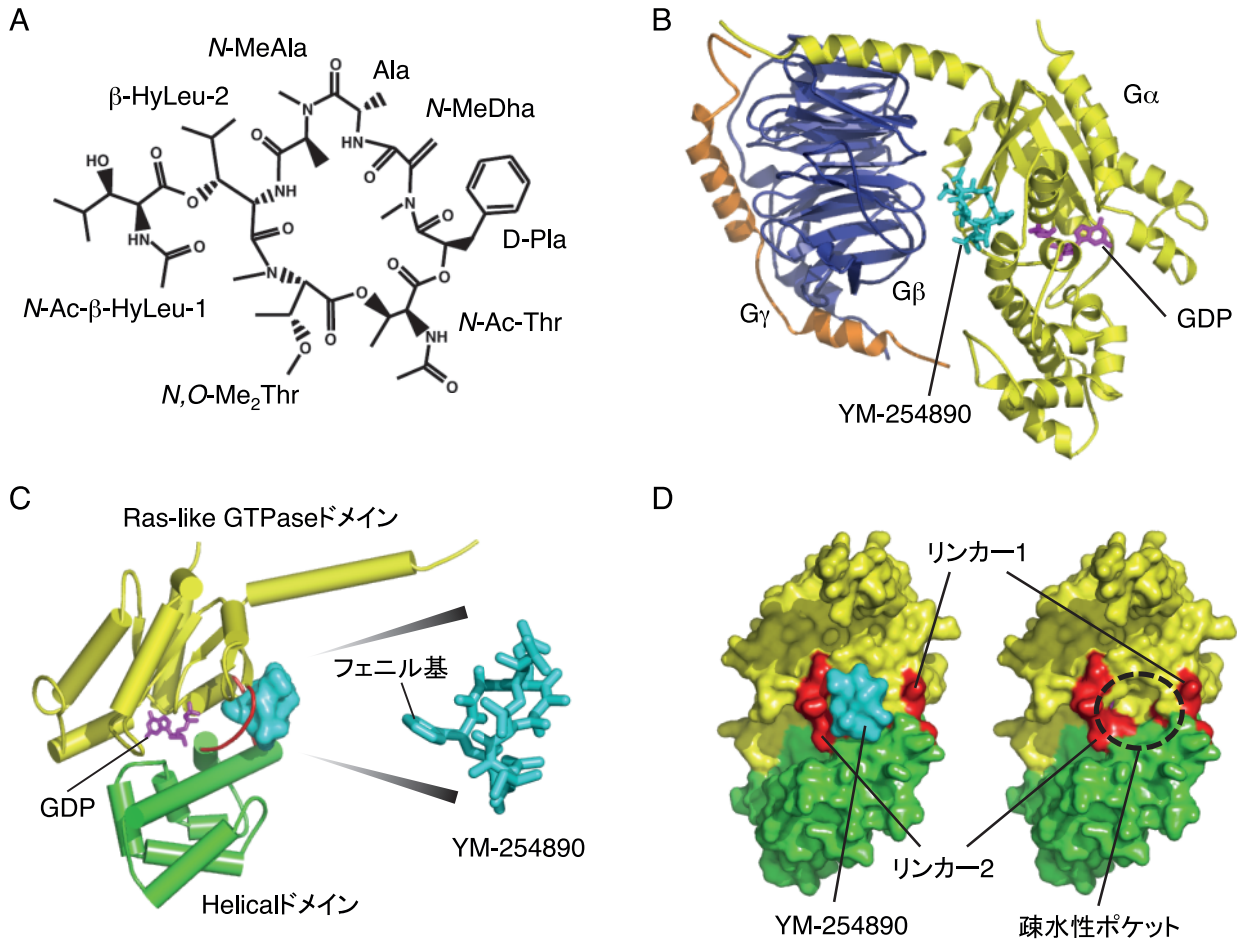


図3 G<sub>α</sub>βγ-YM-254890 複合体の X 線結晶構造解析

(A) YM-254890 の化学構造と構成成分。(B) G<sub>α</sub>βγ-YM-254890 複合体の全体構造 (PDB 番号: 3AH8) (C) YM-254890 と G<sub>α<sub>i</sub></sub> の相互作用の側面図. YM-254890 はフェニル基を頂点とするくさび様の構造をとっており, このフェニル基が先頭となり G<sub>α<sub>i</sub></sub> にはまり込んでいる。(D) G<sub>α<sub>i</sub></sub> の正面図. 左が YM-254890 を含んだ状態で, 右が YM-254890 を除いた状態を示す. YM-254890 は G<sub>α<sub>i</sub></sub> のリンカー 1 とリンカー 2 の間にある疎水性ポケット部分に結合していることがわかる.

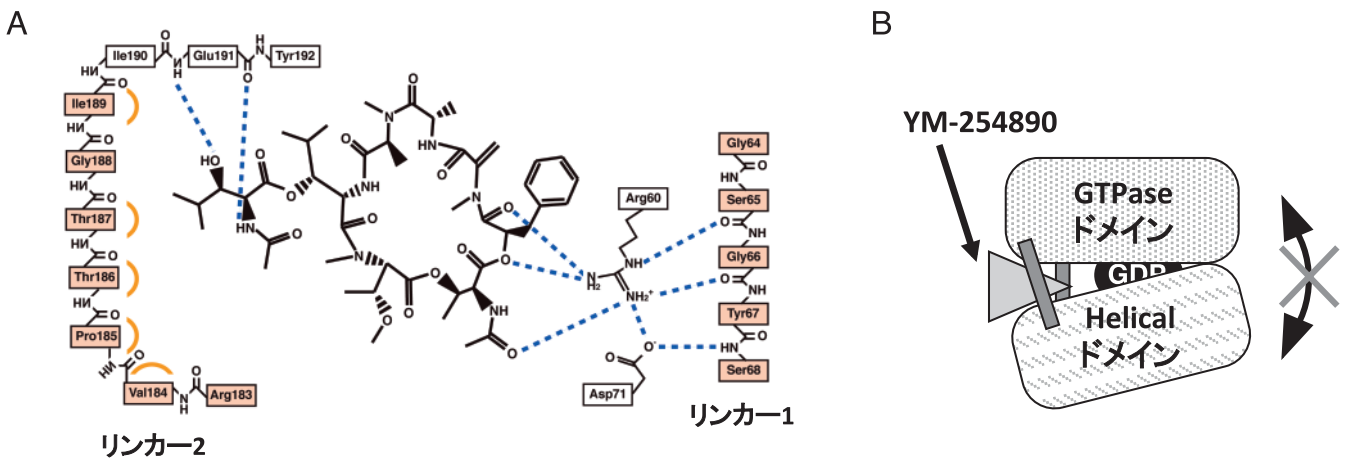


図4 YM-254890 の作用モデル

(A) YM-254890 と G<sub>α<sub>i</sub></sub> リンカー領域の相互作用の概略図. リンカー 1 はグリシン 64 番からセリン 68 番, リンカー 2 はアルギニン 183 番からイソロイシン 189 番である. 破線は YM-254890 と G<sub>α<sub>i</sub></sub> 間で形成される水素結合を示す. 曲線が描かれたアミノ酸は YM-254890 との間で疎水性相互作用を形成している。(B) YM-254890 の作用モデル図. YM-254890 が G<sub>α<sub>i</sub></sub> の両リンカー部分に結合することによりリンカーの構造を固定化し, ヌクレオチド交換に必要なドメインの開口が阻害される.

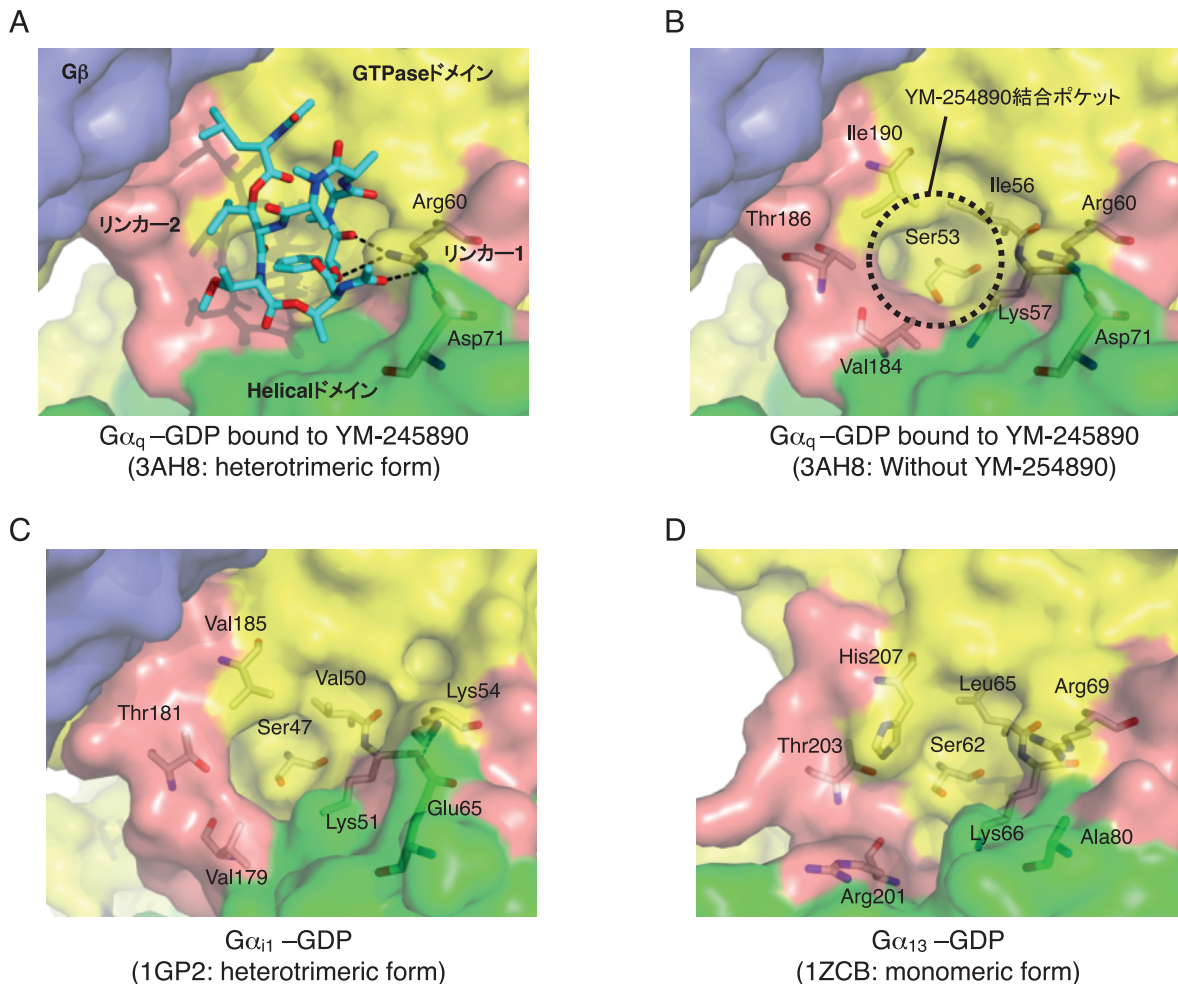


図5 YM-254890 結合ポケットの各  $G\alpha$  間での構造比較

(A)  $G\alpha_q$  の YM-254890 結合ポケット部分の構造. (B) A から YM-254890 の構造を除いたもの. (C)  $G\alpha\beta\gamma$  (PDB 番号: 1GP2) の YM-254890 結合ポケットに相当する部分の構造. (D)  $G\alpha_{13}$  (PDB 番号: 1ZCB) の YM-254890 結合ポケットに相当する部分の構造.

いた. 実際, 電子スピン標識 (electron spin label) 法等を用いたいくつかの実験から  $G\alpha$  の二つのドメインが閉閉する構造変化が予想されていたが<sup>9~14)</sup>, 結晶構造解析に基づく詳細なメカニズムは長らく不明であった. しかし, 最近  $\beta$  アドレナリン受容体と  $G$  タンパク質複合体の X 線結晶構造解析から, GDP 解離状態の  $G$  タンパク質の構造が明らかとなった<sup>2)</sup>. 図 1C 右側に示すように, リガンドにより活性化された受容体が  $G$  タンパク質と結合しグアニンヌクレオチドが結合していない場合には 2 本のリンカー領域が“ちょうつがい”のように動くことによって Helical ドメインが GTPase ドメインから離れるように大きくシフトしていた. この構造変化により GTPase ドメインに結合した GDP は外部に露出し, GDP の解離と GTP の取り込みが起これと考えられる. GTP が結合後, Helical ドメインは元の位置に戻ると共に GTPase ドメイン内の三つのスイッチ領域の構造が変化し,  $G\alpha$  は  $G\beta\gamma$  から解離する (図

1D).

### 3. G タンパク質の活性に影響を与える細菌毒素

$G$  タンパク質の活性を制御する分子として私達の細胞は GPCR, RGS, Ric-8 といった分子を持っているが, 細菌が産生する毒素の中にも  $G$  タンパク質を標的としその活性に影響を与えるものが存在する. 本節ではこれらの細菌毒素の作用メカニズムについて概略するとともに, 土壌細菌から単離された  $G_q$  選択的阻害剤 YM-254890 の作用メカニズムに関する筆者らの研究結果について紹介する.

#### 3-1. コレラ毒素

コレラ毒素はコレラ菌が産生するタンパク質毒素であり, ヒト腸管上皮細胞に作用して重篤な下痢を引き起こす. この毒素は一つの A サブユニットと五つの B サブユニット (B1, B2, B3, B4, B5) から構成されており, さ

らにAサブユニットは翻訳後プロテアーゼによりA1とA2フラグメントに切断される。このうち標的細胞内に侵入し毒素活性を示すのはA1フラグメントである。一方、Bオリゴマーは標的細胞表面に存在するGM1ガングリオシドに結合し、毒素の標的細胞への侵入を手助けしている<sup>15)</sup>。標的細胞内に侵入したA1フラグメントはADPリボシル化酵素として働き、G $\alpha_s$ のアルギニン201番にNADのADPリボシル基を特異的に共有結合させる(図2)<sup>16)</sup>。このアルギニン残基はGTPase活性に非常に重要であり、ADPリボシル化修飾によってG $\alpha_s$ はGTPase活性を消失した恒常活性化状態となり、細胞内のcAMP濃度が持続的に上昇する。コレラ毒素の標的となるのはG $\alpha_s$ とG $\alpha_i$ のみであるが、アルギニン残基は全てのG $\alpha$ 間に保存されており、アミノ酸置換によっても恒常活性化型G $\alpha$ に変化することが知られている<sup>17)</sup>。CasselとSelingerらはコレラ毒素によりGTPase活性が消失し、恒常的に活性化されることを示唆し、このGTPが分解されてGDPになることがシグナル情報伝達系のシャットオフに極めて大事であることを示した<sup>18)</sup>。その後のがん遺伝子研究から、細胞をがん化するoncogenic Rasにおいても12番目のグリシンや61番目のグルタミンの変異が見いだされ、その変異によりGTPase活性が低下し、増殖因子の非存在下でも常に細胞内でGTPが結合した活性型が存在することが、がん化の原因であるとするモデルの基礎となった。

### 3-2. 百日咳毒素

百日咳毒素は百日咳菌が産生するタンパク質毒素であり、5種6個のサブユニットから構成されている。Aプロトマーと呼ばれるS1サブユニットは標的細胞内に侵入し毒素活性を示す。一方、S2, S3, S5それぞれ1分子と2分子のS4から構成されるBオリゴマーは標的細胞表面と結合しAプロトマーを細胞内に送り込む役割を担っている<sup>19)</sup>。百日咳毒素もコレラ毒素と同様にADPリボシル化酵素として働きかつ標的細胞のcAMP濃度の上昇を引き起こすが、その作用機序はコレラ毒素とは異なっている。百日咳毒素はG $\beta$ ファミリー $\alpha$ サブユニットに保存されたC末端から4番目のシステイン残基をADPリボシル化することでGタンパク質と受容体の相互作用を阻害する(図2)<sup>20)</sup>。ADPリボシル化されたG $\alpha_i$ は受容体からの情報を受け取れず、その結果としてG $\beta$ シグナル経路が阻害される。アデニル酸シクラーゼを活性化するG $\alpha_s$ (stimulatory)に対比してアデニル酸シクラーゼを抑制する活性よりG $\alpha_i$ (inhibitory)と呼ばれるようになった。好中球では、細菌由来のN末端のメチオニンがホルミル化されたペプチドを認識するfMLP受容体によりG $\beta$ が活性化され、その際G $\alpha_s$ より解離したG $\beta\gamma$ がホスホリパーゼC $\beta$ を活性化して細胞内カルシウムの上昇を引き起こすため、百日咳毒素処理に

よりカルシウム応答が阻害される。

### 3-3. パスツレラ毒素

パスツレラ毒素はパスツレラ菌が産生するタンパク質毒素であり、G $\alpha_q$ , G $\alpha_{12/13}$ , G $\alpha_i$ シグナルを活性化する<sup>21-23)</sup>。その作用機序は長らく不明であったが、近年、Orthらによりこの毒素が脱アミド化酵素として働くことが報告された<sup>24)</sup>。G $\alpha_{12}$ のグルタミン205番はGTP加水分解反応に必要な水分子の適切な配置と加水分解反応時の塩基触媒として機能している。パスツレラ毒素はこのグルタミン残基を脱アミド化することでグルタミン酸に置換する(図2)。その結果、G $\alpha$ のGTPase活性が消失し、恒常活性化型G $\alpha$ に変化する。コレラ毒素の修飾部位であるアルギニン残基と同様に、このグルタミン残基に変異を導入することによってもGTPase活性は減弱し、これまでにいくつかのがん細胞のG $\alpha_s$ , G $\alpha_i$ , G $\alpha_q$ においてこのグルタミン残基の変異が同定されている<sup>25-27)</sup>。

### 3-4. YM-254890

YM-254890はADP誘発性の血小板凝集を阻害する化合物として*Chromobacterium*属の土壤細菌QS3666株の培養液から単離された環状デブシペプチドであり、通常の20種類のアミノ酸とは異なるユニークなアミノ酸を含む七つのアミノ酸が環状につながった構造をしている(図3A)<sup>28)</sup>。YM-254890はG $\alpha_q$ ファミリーの中でG $\alpha_q$ , G $\alpha_{11}$ , G $\alpha_{14}$ を介したシグナルを特異的に阻害する<sup>29)</sup>。YM-254890はG $\alpha_q$ シグナルを阻害する初めての膜透過性低分子化合物であり、G $\alpha_q$ シグナルを解析する上での非常に有用なツールになると期待される。その作用機序としてCHO細胞膜標品においてGPCR刺激依存的なG $\alpha_q\beta\gamma$ へのGTP $\gamma$ S結合を阻害することから、G $\alpha_q$ のGTPaseサイクルの阻害が示唆されていた<sup>29)</sup>。筆者らは生化学的、構造生物学的アプローチからより詳細なYM-254890の作用メカニズムの解析を行った<sup>3)</sup>。

まず精製G $\alpha_q$ タンパク質を用いた<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S結合実験と<sup>3</sup>H]GDP解離実験から、YM-254890はG $\alpha_q$ に直接作用しその活性化、特にG $\alpha_q$ からのGDP解離を抑制することが判明した。一方、G $\alpha_s$ , G $\alpha_i$ , G $\alpha_o$ , G $\alpha_{13}$ といった他のG $\alpha$ サブファミリーに対しては抑制効果を示さないことが*in vitro*の解析からも明らかとなった。GDPの解離を抑制する分子はGDI(GDP dissociation inhibitor)と呼ばれ、これまでにGoLocoモチーフを持つ分子がGDIとして機能することが知られている<sup>30,31)</sup>。このモチーフはRGS12のハエホモログであるLocoと哺乳動物のRGS間での配列比較から同定された19アミノ酸からなるモチーフで、GDP型のG $\alpha_{16}$ ファミリーと特異的に結合しGDP解離を抑制する。GoLocoはG $\alpha_i$ のGDP/GTP交換反応を抑制するが、細胞レベルにおいてはG $\beta$ シグナルに対して促進的に機能

する分子として知られている。それは GoLoco が  $G\alpha$  からの  $G\beta\gamma$  の遊離を促進するからである<sup>32,33</sup>。X線結晶構造解析の結果、 $G\alpha$  上の GoLoco 結合領域は  $G\beta\gamma$  結合領域と一部オーバーラップしており<sup>34</sup>、それゆえに GoLoco は  $G\alpha$  からの  $G\beta\gamma$  解離を促進し、フリーとなった  $G\beta\gamma$  がエフェクターと結合してシグナルを活性化すると考えられている。一方、YM-254890 は  $G\alpha_q$  単量体のみならず  $G_q\alpha\beta\gamma$  三量体に対してほぼ同程度の濃度で作用することから、 $G\beta\gamma$  と拮抗せず、 $G\beta\gamma$  シグナル経路を活性化しない。

YM-254890 の作用機序を原子レベルで明らかにするために、筆者らは  $G_q\alpha\beta\gamma$  と YM-254890 複合体の X線結晶構造解析を行った。得られた複合体構造を図 3B に示す。まず  $G_q\alpha\beta\gamma$  の全体構造はこれまでに報告されている  $G_q\alpha\beta\gamma$ <sup>35</sup>、 $G_q\alpha\beta\gamma$ <sup>36</sup> とほぼ一致しており、YM-254890 の結合は  $G\alpha$  と  $G\beta\gamma$  の結合様式に影響を与えなかった。また  $G\alpha_q$  の構造に関しても大きな変化は見られず、特に三つのスイッチ領域は典型的な GDP 結合型の構造をとっていた。YM-254890 はフェニル基を頂点とするくさび形の構造をとっており、このフェニル基が  $G\alpha_q$  の 2 本のリンカー領域に挟まれた位置に存在する疎水性のポケットの奥にはまり込んでいた (図 3C, D)。これまでに  $G\alpha$  と相互作用分子の複合体構造はいくつか報告されているが<sup>34-40</sup>、YM-254890 が結合する部位と同じ部位に結合する分子は知られていない。

次に構造解析から予想される YM-254890 の作用機序について説明する。GDP の解離を抑制するモデルとしてまず考えられるのが、GDP と直接結合することによりその解離を抑制するモデルである。実際、 $G\alpha_i$  に対する GDI として機能する GoLoco は Asp/Glu-Gln-Arg triad 内のアルギニン側鎖が GDP の  $\alpha$  位と  $\beta$  位のリン酸と結合している。アルギニン残基を変異させると GDI 活性が低下することから、この直接の結合が GoLoco の作用機序の一つと考えられている<sup>34</sup>。一方、YM-254890 は GDP とは離れた位置に結合していることから別のメカニズムが予想された。前述した  $\beta$  アドレナリン受容体と G タンパク質の複合体の結晶構造から明らかのように、GDP 解離時には  $G\alpha$  の 2 本のリンカー領域のちょうつがい運動により Helical ドメインが GTPase ドメインから離れるように大きくシフトする (図 1C)<sup>9</sup>。これまでに別の実験からもリンカー領域の運動性が  $G\alpha$  の活性に影響を与えることが報告されている<sup>10,14</sup>。注目すべきことに YM-254890 は 2 本のリンカーの間に位置し、両リンカーと相互作用を形成していた (図 4A)。リンカー 1 に関しては、アルギニン 60 番の側鎖を介して YM-254890 とリンカー 1 の主鎖との間で水素結合のネットワークが形成されていた。一方リンカー 2 に関しては、リンカー 2 の全 7 アミノ酸のうち 5 アミノ酸が YM-254890 と疎水性の相互作用を形成しており、またリン

カー 2 直後のグルタミン酸 191 番の主鎖が YM-254890 と水素結合で結ばれていた。YM-254890 は  $G\alpha_q$  の両リンカー領域と相互作用することで、GDP 解離時のドメイン開口に必要なリンカーの運動性を抑制すると考えられた (図 4B)。この考えに一致するように、YM-254890 とリンカー 1 の相互作用に重要なアルギニン 60 番やリンカー 2 内で YM-254890 と疎水性相互作用を形成しているバリン 184 番に変異を加えた変異型  $G\alpha_q$  は野生型  $G\alpha_q$  に比べて YM-254890 感受性が大きく低下した。まとめると、YM-254890 はこれまでによく知られた拮抗 (競争) 阻害剤などとは異なり、二つのドメインをつなぐリンカー部分と相互作用して固定化することで、活性化に必要なドメイン間のコンホメーション変化を抑制するという非常にユニークな作用機序を有することがわかった。不活性フォーム (dead-end form) に固定してその分子の機能を失わせてしまう部位が見つければ、その部位を標的とした低分子化合物の探索から、将来有用な薬剤が開発される可能性がある。

#### 4. G タンパク質の活性を制御する新たな化合物の探索

近年、ハイスループットスクリーニングや *in silico* スクリーニングといった技術を用いて膨大な化合物ライブラリーから特定分子に対する阻害剤を探索する研究が広く行われている。G タンパク質に関しても、これまで紹介した微生物由来の天然物以外に、これらのスクリーニング技術を用いた阻害剤探索の研究がいくつか報告されている。

##### 4-1. M119, Gallein

M119 は  $G\beta\gamma$  表面上でタンパク質間相互作用に関わる領域 (ホットスポット) を標的にした *in silico* スクリーニングから同定された低分子化合物であり、 $G\beta\gamma$  を介したシグナル、特に  $G\beta\gamma$ -ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ )、 $G\beta\gamma$ -ホスホリパーゼ C $\beta$  (PLC $\beta$ ) 経路を阻害する<sup>41</sup>。一方、Gallein は M119 と類似した市販化合物で、M119 と同様の  $G\beta\gamma$  阻害作用を持つ<sup>42</sup>。 $G\beta\gamma$  シグナル経路は心臓血管系の恒常系に重要な役割を担っており、これまでの研究から過剰な  $G\beta\gamma$  シグナルと心不全の関連性が示唆されている<sup>43</sup>。M119 と Gallein は心不全モデルマウスでの心機能不全と心肥大の進行を抑制する効果が報告されており<sup>44</sup>、心不全治療への今後の応用が期待される。加えて、好中球の遊走や炎症反応への抑制効果も報告されている<sup>42</sup>。

##### 4-2. BIM-46174, BIM-46187

BIM-46174 はコレラ毒素による cAMP 産生を抑制する化合物として、低分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより同定された<sup>45</sup>。また  $G_s$ 、 $G_i$ 、 $G_q$  経路を活性化するさまざまな GPCR に対しても抑制効果を示す幅

広いGPCR阻害剤であることが報告されている。BIM-46187はBIM-46174同様のGPCRシグナル阻害効果を示し、化学的により安定な構造を持っている<sup>46)</sup>。これらの化合物はG $\alpha$ に結合することで適切なGPCR-G $\alpha\beta\gamma$ 間の相互作用を阻害し、その結果としてGPCRによるG $\alpha$ のGDP/GTP交換を抑制することが報告されている<sup>47)</sup>。がん細胞に対するBIM-46187の抑制効果も報告されているが、この化合物がG $\alpha$ のどの部位と結合するかは明らかとなっていない。

一方、今回筆者らの構造解析から明らかとなったYM-254890結合位置のポケット構造は他のG $\alpha$ においても確認され、さらにそのポケットの形状は各G $\alpha$ 間で変化に富んでいる(図5)。それゆえに、このポケットは今後*in silico*スクリーニングを用いて各G $\alpha$ の特異的阻害剤を設計する上での有力な候補部位になると思われる。そのような研究により得られた阻害剤は、基礎研究への貢献のみならず、Gタンパク質関連疾患に対する創薬研究への応用にも期待される。

### 5. 非受容体型Gタンパク質制御因子Ric-8の機能

Ric-8は線虫において、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤に耐性を示す変異体のスクリーニングにより、神経伝達物質の放出を調節するG $_q$ シグナルを正に調節する因子として同定された<sup>48)</sup>。近年の線虫やショウジョウバエを用いた遺伝学的研究により、細胞の非対称分裂におけるGPCR非依存的なGタンパク質の活性調節の重要性が明らかにされつつある。線虫及びショウジョウバエRic-8は非対称分裂に必須の因子であることが証明され、新たなGタンパク質調節因子として注目されている。線虫やショウジョウバエといった無脊椎動物にはRic-8は1種類しか存在しないのに対し、哺乳類には二つのRic-8のホモログRic-8A及びRic-8Bが存在する。最近の解析により見いだされた哺乳類Ric-8の機能は、無脊椎動物における*ric-8*変異体で見られた表現型を説明するものであり、Ric-8によるGタンパク質調節機構は進化の過程で保存されたシステムであることが示唆されている。

本稿では、まず無脊椎動物Ric-8の非対称分裂における役割について概説し、次に哺乳類Ric-8の機能について最新の知見と筆者らの研究結果について紹介する。なお、本稿では線虫やショウジョウバエの非対称分裂におけるRic-8の役割を概説するとともに、非対称分裂の詳細については他の総説を参照されたい<sup>49-52)</sup>。

### 6. 無脊椎動物のRic-8と細胞の非対称分裂

細胞の非対称分裂は多細胞生物における細胞の多様性を生み出す上で極めて重要なシステムである。近年の線虫の初期胚及びショウジョウバエの神経芽細胞を用いた遺伝学

的解析により、非対称分裂のメカニズムの理解が大きく進展し、それに関わる因子は生物種を超えてよく保存されていることが明らかになった。興味深いことに、非対称分裂に必須のコンポーネントとしてG $_i$ ファミリーの三量体Gタンパク質とその関連分子が相次いで同定された。

線虫の初期胚は精子の侵入をきっかけに極性が生じ、精子の侵入側が後方となって前後軸が形成される。最終的な分裂面の位置は紡錘体や星状体微小管の形成中心となる中心体の位置に依存する。中心体はG $\alpha$ と幾つかのGタンパク質活性調節因子から構成される複合体によって生み出されるpulling force(紡錘体を両軸側に引く力)により牽引される。後述するようにG $\alpha$ 複合体のコンポーネントの非対称な局在により両軸側からのpulling forceに偏りが生じる(図6A)。後軸側からのpulling forceが優位となるため中心体が後軸側により強く引かれ、分裂面は中心より後軸側に形成される。結果として後軸側の小さい細胞と、前軸側の大きい細胞が誕生する。

線虫の初期胚ではG $_i$ ファミリーに属する $\alpha$ サブユニットであるGPA-16とGOA-1が非対称分裂に関わる。*gpa-16*又は*goa-1*変異体では野生型と比較して後軸からのpulling forceが幾分減弱するものの、分裂の非対称性は保持している<sup>53)</sup>。一方、*gpa-16/goa-1*二重変異体はpulling forceの非対称性が失われており、結果として細胞は等分割する<sup>54,55)</sup>。このため、GPA-16とGOA-1は互いに相補的な関係にあることが示唆されている。古典的Gタンパク質活性化モデルではG $\alpha$ のパートナーはG $\beta\gamma$ であるが、非対称分裂中では主要なパートナーはGoLocoドメインを持つGPR(G protein regulator)1/2である<sup>54,55)</sup>。G $\beta$ 遺伝子をコードする*gpb-1*の変異体では過剰なpulling forceが観察される<sup>53)</sup>。*goa-1/gpa16/gpb-1*三重変異体ではそのような表現型は観察されないことから<sup>56)</sup>、G $\beta\gamma$ はG $\alpha$ 活性に対して抑制的に働くことが示唆されている。一方、*gpr1/2*変異体は*gpa-16/goa-1*変異体と同様に細胞は等分割となる<sup>55,56)</sup>。GPR1/2とG $\beta\gamma$ は生化学的にはよく似た活性を示すものの非対称分裂における役割は異なっており、G $\alpha$ /GPR1/2複合体がpulling force形成に重要であると考えられている。興味深いことに、G $\alpha$ は細胞膜において均一な局在を示すのに対して、GPR1/2はpulling forceが強い後軸側の細胞膜で強い局在を示す<sup>55,56)</sup>(図6A)。このことは局所的なGタンパク質の活性調節がpulling forceの非対称性を生み出す原動力となることを示唆している。

古典的なGuanine nucleotide cycleとは異なり、非対称分裂ではGDPからGTPへの交換にGPCRは関与しないと考えられている。Ric-8はGPCRと相同性がないにもかかわらず*in vitro*においてG $\alpha$ に対してGuanine nucleotide exchange factor(GEF)活性を示す<sup>53)</sup>。また、*ric-8*変異体は*goa-1/gpa-16*変異体と同様にpulling forceが低下し、

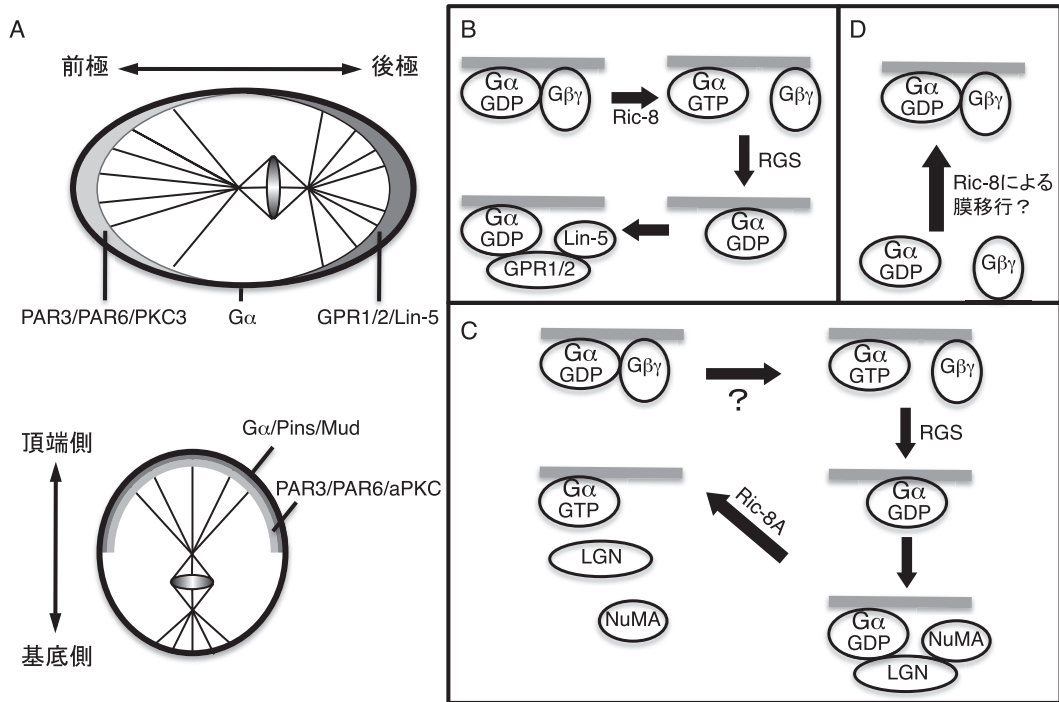


図6 線虫初期胚及びショウジョウバエ神経芽細胞の非対称分裂と Ric-8 の機能

(A) 線虫初期胚 (上段) 及びショウジョウバエ神経芽細胞 (下段) における  $G\alpha$  とその関連分子及び PAR3 複合体の細胞内局在。

(B~D) 非対称分裂における Ric-8 の機能のモデル。

線虫初期胚において Ric-8 は  $G\alpha\beta\gamma$  三量体に対して GEF 活性を示し、 $G\alpha$  と  $G\beta\gamma$  を解離させ、 $G\alpha$  に GPR1/2/Lin-5 が結合するモデルが提唱されている (B)。一方、哺乳類 Ric-8A の生化学的解析により、Ric-8A は  $G\alpha\beta\gamma$  三量体ではなく  $G\alpha$ /LGN/NuMA (線虫  $G\alpha$ /GPR1/2/Lin-5 のホモログ) に対して GEF 活性を示し、 $G\alpha$  から LGN と NuMA を解離させることにより pulling force を引き出すと推測された (C)。ショウジョウバエ神経芽細胞では少なくとも  $G\alpha$  及び  $G\beta\gamma$  の細胞膜局在に Ric-8 は必要であると考えられている (D)。

細胞は等分割する。これらのことから、Ric-8 は非対称分裂におけるグアニンスクレオチドサイクルの一翼を担う分子であると認識されている。しかしながら非対称分裂における Ric-8 の分子機能は依然はっきりとしていない。Afshar らは Ric-8 が  $G\alpha\beta\gamma$  三量体に対して GEF 活性を示すことにより  $G\beta\gamma$  から  $G\alpha$  を解離させ、その後解離した  $G\alpha$  と GPR1/2 が結合することによって pulling force が形成されると推測した<sup>57)</sup> (図 6B)。一方、Tall らは Ric-8A は  $G\alpha\beta\gamma$  三量体には GEF 活性を示さず、むしろ哺乳類における  $G\alpha$  複合体のホモログである  $G\alpha$ /LGN (GPR1/2 のホモログ)/NuMA (Lin-5 のホモログ) 複合体に対して効率的に GEF 活性を示すことを生化学的解析により証明した<sup>58,59)</sup> (図 6C)。このように、Ric-8 がどのような状態の  $G\alpha$  に対して GEF 活性を示すのかは依然混沌としている。さらに、*ric-8* 変異体では顕著な GPA-16 のタンパク質量及び細胞膜局在の減少が観察されることから<sup>60)</sup>、Ric-8 は GEF 活性以外に  $G\alpha$  の細胞膜ターゲティングや発現量調節に関わることも示唆されている (図 6D)。

ショウジョウバエの神経芽細胞の非対称分裂においても

線虫の初期胚の非対称分裂に関連する分子群がよく保存されているが (図 6A)、紡錘体の制御機構は線虫の初期胚とは幾分異なる。線虫の初期胚では紡錘体の pulling force の不均衡により分裂面のずれを生じるが、ショウジョウバエの神経芽細胞では紡錘体自身が基底側にずれるとともに、基底側の紡錘体が頂端側より短くなる。これにより、頂端側の細胞が大きく、基底側が小さくなる。ショウジョウバエの  $G\alpha$  複合体は、極性形成に関わる PAR3 複合体との局在及び上下関係が線虫の場合と異なるものの、紡錘体制御に関わるという点では類似している。ショウジョウバエにおいても *ric-8* 変異体は非対称分裂に重篤な異常を示す。非対称分裂中の神経芽細胞において、*ric-8* 変異体では  $G\alpha$  複合体や  $G\beta 13F$  の細胞膜局在に異常が観察され (図 6D)、結果として細胞は等分割する<sup>61~63)</sup>。この過程における Ric-8 の GEF 活性の必要性は解釈が分かれており、Wang らは免疫沈降実験において GDP 存在下では Ric-8 と  $G\alpha$  の結合が観察されるが、GTP $\gamma$ S 存在下では結合が見られないことから Ric-8 は GEF であると推測している<sup>63)</sup>。一方、Hampelz らは Ric-8 と  $G\alpha$  の結合にグアニンスクレ



オチド依存性は見られないと結論づけている<sup>62)</sup>。ショウジョウバエ Ric-8 の *in vitro* の GEF 活性の報告はなく今後の課題である。いずれにせよ Ric-8 による  $G\alpha_i$  及び関連分子の細胞膜ターゲティングはこの過程において重要なステップであることを強く示唆している。

Ric-8 が非対称分裂中に GEF として機能するという仮説は、非対称分裂における受容体非依存的なグアニンヌクレオチドサイクルの仮説とよく一致するため広く受け入れられている。しかし、実際に細胞内において Ric-8 が GEF 活性を有しているかどうかは検討されていない。そのため、別の仮説として、Ric-8 は細胞内では GEF として機能せず、GPA-16 に対する作用のようにシャペロン様に働くとも考えることもできる。これらの仮説を証明することは容易ではないが、今後、細胞内で G タンパク質活性を直接評価できる系や GEF 活性を欠失した *ric-8* 変異体の解析などによりこの問題のブレイクスルーが期待される。

## 7. 哺乳類の Ric-8

線虫やショウジョウバエでは主に遺伝学的解析により Ric-8 の生理的な機能が明らかにされてきたが、哺乳類においては生化学的な解析と細胞内シグナル伝達の解析が主に行われてきた。2003年に Tall らは  $G\alpha_o$  と  $G\alpha_s$  を bait とした酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより 2 種類の線虫 Ric-8 ホモログ、Ri-8A と Ric-8B を同定し、哺乳類には線虫 Ric-8 のホモログが 2 種類存在することを示した<sup>58)</sup>。哺乳類 Ric-8 の機能として、GEF 活性とシャペロン様活性の二つが提唱されている。

### 7-1. Ric-8 の GEF 活性と細胞内シグナル伝達

酵母ツーハイブリッド法で Ric-8A 及び Ric-8B を同定した Tall らは Ric-8A が  $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_o$ 、 $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{13}$  に対する GEF 活性を示すことを報告し、当時、線虫及びショウジョウバエ Ric-8 を含めて不明であった Ric-8 の分子機能を初めて明らかにした<sup>58)</sup>。その後まもなく線虫 Ric-8 も *in vitro* において GOA-1 (線虫  $G\alpha_o$ ) に対して GEF 活性を示すことが報告され<sup>59)</sup>、GEF 活性が線虫から哺乳類まで保存された機能であることが明らかになった。また、最近 Tall らのグループにより *in vitro* において Ric-8B が  $G\alpha_s$  及び  $G\alpha_{olf}$  に対して GEF 活性を示すことが報告されている<sup>64)</sup>。

筆者らは独自に G タンパク質相互作用因子を探索すべく幾種類もの  $G\alpha$  を bait とした酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、 $G\alpha_q$  および  $G\alpha_i$  と結合する分子として Ric-8A を同定した<sup>65)</sup>。Ric-8 の生化学的機能が明らかになる一方で、Ric-8 の細胞内シグナル伝達に果たす役割については不明であったため、細胞内シグナル伝達における Ric-8A の機能について詳細な解析を行った。培養細胞に Ric-8A に対する低分子干渉 RNA (siRNA) を導入するこ

とにより、細胞外リガンド刺激による  $G\alpha_q$  を介した Erk の活性化及び細胞内  $Ca^{2+}$  上昇が有意に抑制された。このことから筆者らは Ric-8A が *in vitro* のみならず細胞内においても GEF として機能し、GPCR シグナルを増強していると推測した (図 7A)。

Ric-8B の細胞内シグナル伝達に果たす役割については、嗅覚系シグナルへの関与がよく研究されている。Tall らによる Ric-8B の同定から 2 年後の 2005 年に Von Dannecker らは嗅覚系特異的 G タンパク質の  $\alpha$  サブユニットである  $G\alpha_{olf}$  を bait とした酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより Ric-8B を同定した<sup>66)</sup>。 $G\alpha_{olf}$  は  $G\alpha_s$  とアミノ酸レベルで約 90% の相同性を示し  $G\alpha_s$  と同様にアデニル酸シクラーゼを活性化することにより cAMP 産生を促す。 $G\alpha_{olf}$  の発現は嗅覚系細胞に限られるが、マウス脳における Ric-8B の発現パターンは  $G\alpha_{olf}$  のそれとよく一致しており、Ric-8B の嗅覚系への関与が示唆される。Von Dannecker らは、HEK293 細胞にドーパミン D1 受容体又は  $\beta_2$  アドレナリン受容体と  $G\alpha_{olf}$  を共発現させ、それぞれの受容体のリガンドで細胞を刺激することにより細胞内 cAMP が産生され、Ric-8B を共発現させることによりその cAMP 産生が増強することを報告した。この結果と Ric-8A とのアナロジーから、Ric-8B は  $G\alpha_{olf}$  に対して GEF として機能することにより嗅覚シグナルを増強すると推測された。

このような哺乳類 Ric-8 による GPCR シグナル増幅作用は線虫の神経伝達物質放出における  $G_q$  シグナルや<sup>48)</sup>、化学感受性ニューロンを介した摂食行動における  $G\alpha_o$  シグナルについても提唱されており<sup>67)</sup>、進化の過程でよく保存されたシステムであることが示唆される。

### 7-2. Ric-8 による G タンパク質の安定化

線虫やショウジョウバエの *ric-8* 変異体は細胞の非対称分裂に異常をきたすとともに G タンパク質量の低下を伴う。このことから、Ric-8 のシャペロン様活性が推測されてきた。近年、筆者らを含む幾つかのグループの研究により、Ric-8 による G タンパク質発現量維持機構に関する知見が蓄積してきた。

Ric-8B は  $G\alpha_{olf}$  だけではなく  $G\alpha_s$  及び  $G\alpha_q$  とも結合することから<sup>57)</sup>、筆者らは Ric-8B が嗅覚系に限らず様々な細胞応答において普遍的に機能しているのではないかと考え、嗅覚細胞以外の Ric-8B の機能の解析を進めた<sup>6)</sup>。NIH3T3 細胞において Ric-8B の発現を抑制すると、インプロテレンール刺激による cAMP 応答が著明に抑制された。興味深いことに、Ric-8B の発現抑制により  $G\alpha_s$  タンパク質の劇的な減少が観察された。一方、 $G\alpha_i$  以外の  $G\alpha$  と  $G\beta$  の発現には影響がなかったことから、Ric-8B は  $G\alpha_s$  タンパク質量を特異的に調節することが明らかとなった。また、Ric-8B の過剰発現により  $G\alpha_s$  のタンパク質量は増加

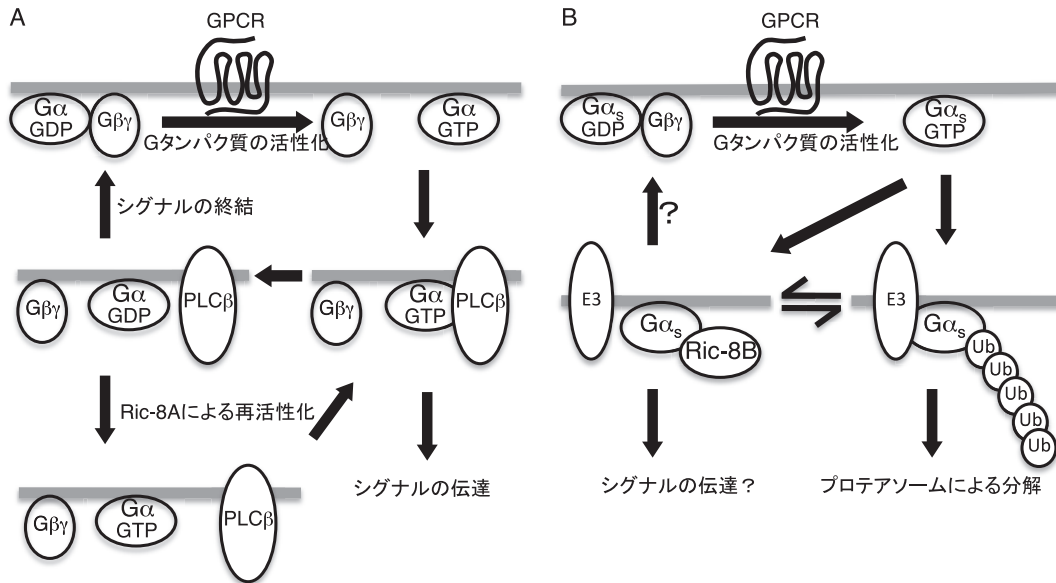


図7 哺乳類 Ric-8, Ric-8A と Ric-8B の細胞内シグナル伝達における役割

(A) 細胞内における Ric-8A の機能のモデル. GPCR により活性化された  $G\alpha$  はエフェクター (ホスホリパーゼ  $C\beta$ : PLC $\beta$ ) を活性化した後, エフェクター及びその他 GAP タンパク質により再び GDP 型へ変換される. このとき, Ric-8A 存在下では  $G\alpha$ -GDP は再び Ric-8A により GTP 型へ再活性化される. この活性化ループにより G タンパク質シグナルの持続性及び強度が調節される.

(B) Ric-8B による  $G\alpha$  のユビキチン化抑制のモデル.  $G\alpha$  はユビキチン化 (Ub) され, プロテアソームにより分解される. Ric-8B と  $G\alpha$  の結合により  $G\alpha$  のユビキチン化は抑制され,  $G\alpha$  は安定化する. Ric-8B と結合した  $G\alpha$  の機能性や  $G\alpha$  をユビキチン化する E3 リガーゼなど不明な点が多い.

するが, mRNA 発現量には影響を与えなかったことから, 筆者らは Ric-8B による  $G\alpha_s$  タンパク質量増加作用は翻訳後のステップであると考え, タンパク質の安定性を普遍的に制御するユビキチン-プロテアソーム系に注目した.  $G\alpha$  が細胞内でユビキチン化されるかどうか HEK293T 細胞を用いて検討したところ, 明確な  $G\alpha_s$  のユビキチン化が確認された. また, 細胞をプロテアソーム阻害剤である MG132 で処理することにより  $G\alpha_s$  のタンパク質量の増加と  $G_s$  シグナルの増強が見られたことから,  $G\alpha$  が細胞内においてユビキチン-プロテアソーム系による制御を受けていることが明らかになった. 一方, Ric-8B の過剰発現により  $G\alpha_s$  のユビキチン化が顕著に抑制された. さらに  $G\alpha_s$  との結合能が著しく低下した Ric-8B のスプライシングバリエント及び Ric-8B との結合能が低下した  $G\alpha_s$  変異体を用いた解析から, Ric-8B と  $G\alpha_s$  の結合が  $G\alpha_s$  のユビキチン化の抑制に重要であることが判明した. 以上のように, 筆者らは Ric-8B が  $G\alpha_s$  の分解を抑制することにより  $G_s$  シグナルを亢進するという, これまでのグアニンヌクレオチドに依存した質的な G タンパク質活性制御機構とは異なる, G タンパク質の量的制御という新たな G タンパク質制御機構を提唱した (図 7B).

ごく最近, Tall らのグループは Ric-8A<sup>-/-</sup>及び Ric-8B<sup>-/-</sup> ES 細胞の解析から, Ric-8 が G タンパク質の量的調節に極めて重要な役割を果たすことを報告した<sup>7)</sup>. Ric-8A<sup>-/-</sup>細

胞では  $G\alpha_{i1/2}$ ,  $G\alpha_o$ ,  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{13}$  のタンパク質量が野生型細胞と比較して 90% 以下に減少した. 一方, Ric-8B<sup>-/-</sup>細胞では  $G\alpha_s$  タンパク質量のみが同様に減少した. 野生型細胞と比較して, Ric-8A<sup>-/-</sup>細胞では翻訳直後の  $G\alpha_{i1/2}$  の細胞膜画分における存在量が減少し, 細胞質画分における量が増加していた. この傾向は  $G\alpha_q$  ではより顕著であった. さらに, Ric-8A<sup>-/-</sup>細胞では  $G\alpha_{i1/2}$ ,  $G\alpha_q$  及び  $G\beta$  タンパク質の半減期が著しく短くなっていた. 以上の結果から, Ric-8 は G タンパク質に対する分子シャペロンとして機能し, 特に翻訳直後の  $G\alpha$  の細胞膜移行を促すものと考えられている.

### 7-3. Ric-8A による細胞分裂調節

線虫やショウジョウバエの非対称分裂と同様に, 哺乳動物の細胞分裂においても  $G\alpha$  及びその関連分子は紡錘体の制御に関わる<sup>68)</sup>. 最近, Kehrl らのグループは細胞分裂における Ric-8A の役割について報告した<sup>69)</sup>. HeLa 細胞では接着基質 (培養皿) と細胞の接着面に対して平行に紡錘体が形成されるが, Ric-8A を発現抑制した細胞や百日咳毒素処理により  $G\alpha_s$  と Ric-8A の結合を阻害した細胞ではこの極性が見られず,  $G\alpha_s$ , LGN, NuMA 及びダイニンの細胞膜局在も阻害されていた. これらのことから, Ric-8A は哺乳動物細胞の分裂において  $G\alpha$  複合体の細胞膜局在を補助し, 適切な紡錘体の配向を規定するという, ショウ

ジョウバエ Ric-8 と類似した機能を持つことが明らかになった。哺乳類の非対称分裂における Ric-8A の関与は現在までに明らかにされていないが、近年、哺乳類の神経細胞においても三量体 G タンパク質シグナルの活性調節が非対称分裂における適切な紡錘体の配向決定に必要であることが報告されている<sup>70,71)</sup>。線虫やショウジョウバエのアナロジーから Ric-8A も非対称分裂の構成因子である可能性が考えられ、今後の解析が待たれる。

線虫の神経伝達物質放出を制御する因子として Ric-8 が同定されて以来、無脊椎動物の遺伝学的解析から生理的機能が、主に哺乳類 Ric-8 の解析から分子機能が明らかにされつつある。しかしながら生理的機能と分子機能を直接結びつけて理解するにはまだ至っていないのが現状である。非対称分裂に GEF 活性が必要であるかどうかは現時点では不明であり、今後の課題として残されている。

## 8. おわりに

細胞のシグナル伝達研究において 1971 年 Sutherland によるセカンドメッセンジャー cAMP の発見、1992 年 Krebs と Fisher によるタンパク質リン酸化酵素の発見、1994 年 Gilman と Rodbell による G タンパク質の発見、そして 2012 年に Lefkowitz と Kobilka による GPCR 研究にノーベル賞が授与された。さらに GPCR リガンド研究として 1982 年 Samuelsson, Bergstrom, Vane らにプロスタグランジンやロイコトリエンの発見、1988 年 Black にアドレナリンとヒスタミン受容体アンタゴニストの開発、また神経機能モデルとして 2004 年 Axel と Buck による匂い受容体と嗅覚システム研究にもノーベル賞が与えられている。これらからも G タンパク質シグナル研究の重要性、すなわち社会への影響と貢献度が認められているといえる。今後も生体の恒常性の維持に必須の神経系、循環器系、内分泌系、生体防御系システム、さらに発生過程における G タンパク質シグナルの制御機構の解明から目を離すことはできず、新たに得られた研究成果を基にした新規プローブや薬剤の開発が期待されている。

## 文 献

- 1) Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., & Satoh, T. (1991) *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 349-400.
- 2) Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J.M., Shah, S.T., Lyons, J.A., Caffrey, M., Gellman, S.H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W.I., Sunahara, R.K., & Kobilka, B.K. (2011) *Nature*, **477**, 549-555.
- 3) Nishimura, A., Kitano, K., Takasaki, J., Taniguchi, M., Mizuno, N., Tago, K., Hakoshima, T., & Itoh, H. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 13666-13671.
- 4) Ross, E.M. & Wilkie, T.M. (2000) *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 795-827.
- 5) Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G., & Kobilka, B.K. (2009) *Nature*, **459**, 356-363.
- 6) Nagai, Y., Nishimura, A., Tago, K., Mizuno, N., & Itoh, H. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 11114-11120.
- 7) Gabay, M., Pinter, M.E., Wright, F.A., Chan, P., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., & Tall, G.G. (2011) *Sci. Signal.*, **4**, ra79.
- 8) Sprang, S.R. (1997) *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 639-678.
- 9) Oldham, W.M. & Hamm, H.E. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **9**, 60-71.
- 10) Oldham, W.M., Van Eps, N., Preninger, A.M., Hubbell, W.L., & Hamm, H.E. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7927-7932.
- 11) Remmers, A.E., Engel, C., Liu, M., & Neubig, R.R. (1999) *Biochemistry*, **38**, 13795-13800.
- 12) Gales, C., Van Durm, J.J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., & Bouvier, M. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 778-786.
- 13) Ceruso, M.A., Periole, X., & Weinstein, H. (2004) *J. Mol. Biol.*, **338**, 469-481.
- 14) Majumdar, S., Ramachandran, S., & Cerione, R.A. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 40137-40145.
- 15) Vanden Broeck, D., Horvath, C., & De Wolf, M.J. (2007) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **39**, 1771-1775.
- 16) Cassel, D. & Pfeuffer, T. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2669-2673.
- 17) Freissmuth, M. & Gilman, A.G. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 21907-21914.
- 18) Cassel, D. & Selinger, Z. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3307-3311.
- 19) Kaslow, H.R. & Burns, D.L. (1992) *FASEB J.*, **6**, 2684-2690.
- 20) Katada, T. & Ui, M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3129-3133.
- 21) Zywiets, A., Gohla, A., Schmelz, M., Schultz, G., & Offermanns, S. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 3840-3845.
- 22) Orth, J.H., Lang, S., Taniguchi, M., & Aktories, K. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 36701-36707.
- 23) Orth, J.H., Fester, I., Preuss, I., Agnoletto, L., Wilson, B.A., & Aktories, K. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 23288-23294.
- 24) Orth, J.H., Preuss, I., Fester, I., Schlosser, A., Wilson, B.A., & Aktories, K. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 7179-7184.
- 25) Landis, C.A., Masters, S.B., Spada, A., Pace, A.M., Bourne, H.R., & Vallar, L. (1989) *Nature*, **340**, 692-696.
- 26) Lyons, J., Landis, C.A., Harsh, G., Vallar, L., Grünwald, K., Feichtinger, H., Duh, Q.Y., Clark, O.H., Kawasaki, E., Bourne, H.R., & McCormick, F. (1990) *Science*, **249**, 655-659.
- 27) Van Raamsdonk, C.D., Bezrookove, V., Green, G., Bauer, J., Gaugler, L., O'Brien, J.M., Simpson, E.M., Barsh, G.S., & Bastian, B.C. (2009) *Nature*, **457**, 599-602.
- 28) Taniguchi, M., Nagai, K., Arao, N., Kawasaki, T., Saito, T., Moritani, Y., Takasaki, J., Hayashi, K., Fujita, S., Suzuki, K., & Tsukamoto, S. (2003) *J. Antibiot. (Tokyo)*, **56**, 358-363.
- 29) Takasaki, J., Saito, T., Taniguchi, M., Kawasaki, T., Moritani, Y., Hayashi, K., & Kobori, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 47438-47445.
- 30) De Vries, L., Fischer, T., Tronchère, H., Brothers, G.M., Strockbine, B., Siderovski, D.P., & Farquhar, M.G. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14364-14369.
- 31) Natochin, M., Lester, B., Peterson, Y.K., Bernard, M.L., Lanier, S.M., & Artemyev, N.O. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**,

- 40981–40985.
- 32) Bernard, M.L., Peterson, Y.K., Chung, P., Jourdan, J., & Lanier, S.M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 1585–1593.
  - 33) Natchin, M., Gasimov, K.G., & Artemyev, N.O. (2001) *Biochemistry*, **40**, 5322–5328.
  - 34) Kimple, R.J., Kimple, M.E., Betts, L., Sondek, J., & Siderovski, D.P. (2002) *Nature*, **416**, 878–881.
  - 35) Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iñiguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G., & Sprang, S.R. (1995) *Cell*, **83**, 1047–1058.
  - 36) Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H. E., & Sigler, P.B. (1996) *Nature*, **379**, 311–319.
  - 37) Tesmer, V.M., Kawano, T., Shankaranarayanan, A., Kozasa, T., & Tesmer, J.J. (2005) *Science*, **310**, 1686–1690.
  - 38) Lutz, S., Shankaranarayanan, A., Coco, C., Ridilla, M., Nance, M.R., Vettel, C., Baltus, D., Evelyn, C.R., Neubig, R.R., Wieland, T., & Tesmer, J.J. (2007) *Science*, **318**, 1923–1927.
  - 39) Oldham, W.M. & Hamm, H.E. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 60–71.
  - 40) Johnston, C.A. & Siderovski, D.P. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2001–2006.
  - 41) Bonacci, T.M., Mathews, J.L., Yuan, C., Lehmann, D.M., Malik, S., Wu, D., Font, J.L., Bidlack, J.M., & Smrcka, A.V. (2006) *Science*, **312**, 443–446.
  - 42) Lehmann, D.M., Seneviratne, A.M., & Smrcka, A.V. (2008) *Mol. Pharmacol.*, **73**, 410–418.
  - 43) Kamal, F.A., Smrcka, A.V., & Blaxall, B.C. (2011) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **51**, 462–467.
  - 44) Casey, L.M., Pistner, A.R., Belmonte, S.L., Migdalovich, D., Stolpnik, O., Nwakanma, F.E., Vorobiof, G., Dunaevsky, O., Matavel, A., Lopes, C.M., Smrcka, A.V., & Blaxall, B.C. (2010) *Circ. Res.*, **107**, 532–539.
  - 45) Prévost, G.P., Lonchamp, M.O., Holbeck, S., Attoub, S., Zaharevitz, D., Alley, M., Wright, J., Brezak, M.C., Coulomb, H., Savola, A., Huchet, M., Chaumeron, S., Nguyen, Q.D., Forgez, P., Bruyneel, E., Bracke, M., Ferrandis, E., Roubert, P., Demarquay, D., Gespach, C., & Kasprzyk, P.G. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 9227–9234.
  - 46) Favre-Guilmard, C., Zeroual-Hider, H., Soulard, C., Touvy, C., Chabrier, P.E., Prévost, G., & Auguet, M. (2008) *Eur. J. Pharmacol.*, **594**, 70–76.
  - 47) Ayoub, M.A., Damian, M., Gespach, C., Ferrandis, E., Lavergne, O., De Wever, O., Banères, J.L., Pin, J.P., & Prévost, G.P. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 29136–29145.
  - 48) Miller, K.G., Emerson, M.D., McManus, J.R., & Rand, J.B. (2000) *Neuron*, **27**, 289–299.
  - 49) Gonczy, P. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 355–366.
  - 50) Morin, X. & Bellaïche, Y. (2011) *Dev. Cell*, **21**, 102–119.
  - 51) Neumüller, R.A. & Knoblich, J.A. (2009) *Genes Dev.*, **23**, 2675–2699.
  - 52) Yu, F., Kuo, C.T., & Jan, Y.N. (2006) *Neuron*, **51**, 13–20.
  - 53) Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Johnston, C.A., McCudden, C.R., Siderovski, D.P., & Gonczy, P. (2004) *Cell*, **119**, 219–230.
  - 54) Gotta, M. & Ahringer, J. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**, 297–300.
  - 55) Colombo, K., Grill, S.W., Kimple, R.J., Willard, F.S., Siderovski, D.P., & Gonczy, P. (2003) *Science*, **300**, 1957–1961.
  - 56) Gotta, M., Dong, Y., Peterson, Y.K., Lanier, S.M., & Ahringer, J. (2003) *Curr. Biol.*, **13**, 1029–1037.
  - 57) Tsou, M.F., Hayashi, A., & Rose, L.S. (2003) *Development*, **130**, 5717–5730.
  - 58) Tall, G.G., Krumins, A.M., & Gilman, A.G. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 8356–8362.
  - 59) Tall, G.G. & Gilman, A.G. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 16584–16589.
  - 60) Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Siderovski, D.P., & Gonczy, P. (2005) *Development*, **132**, 4449–4459.
  - 61) David, N.B., Martin, C.A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., & Bellaïche, Y. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 1083–1090.
  - 62) Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S.K., Dunican, D., & Knoblich, J.A. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 1099–1105.
  - 63) Wang, H., Ng, K.H., Qian, H., Siderovski, D.P., Chia, W., & Yu, F. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 1091–1098.
  - 64) Chan, P., Gabay, M., Wright, F.A., & Tall, G.G. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 19932–19942.
  - 65) Nishimura, A., Okamoto, M., Sugawara, Y., Mizuno, N., Yamauchi, J., & Itoh, H. (2006) *Genes Cells*, **11**, 487–498.
  - 66) Von Dannecker, L.E., Mercadante, A.F., & Malnic, B. (2005) *J. Neurosci.*, **25**, 3793–3800.
  - 67) Hofler, C. & Koelle, M.R. (2011) *J. Neurosci.*, **31**, 11553–11562.
  - 68) Cho, H. & Kehrl, J.H. (2008) *Cell. Cycle*, **7**, 573–577.
  - 69) Woodard, G.E., Huang, N.N., Cho, H., Miki, T., Tall, G.G., & Kehrl, J.H. (2010) *Mol. Cell Biol.*, **30**, 3519–3530.
  - 70) Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., & Matsuzaki, F. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 93–101.
  - 71) Sanada, K. & Tsai, L.H. (2005) *Cell*, **122**, 119–131.
-