

G タンパク質共役型受容体機能の会合タンパク質による調節

中畑 則道,^{*,a,b} 斎藤 将樹^{a,b}

Regulation of G Protein-coupled Receptor Function by Its Binding Proteins

Norimichi NAKAHATA,^{*,a,b} and Masaki SAITO^{a,b}

^aDepartment of Cellular Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, and ^bTohoku University 21st Century COE Program “CRESCENDO”, 6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai City 980-8578, Japan

(Received September 11, 2006)

G protein-coupled receptors (GPCRs) are seven transmembrane receptors with an *N*-terminus in the extracellular region and *C*-terminus in the intracellular region. When an agonist binds to a GPCR, a signal is transduced into a cell through the activation of trimeric G proteins. Recently, it has been shown that the activities of GPCRs are regulated by multiple mechanisms. One of the mechanisms is regulation through the binding proteins to the carboxy (*C*)-terminus of GPCRs. In the present study, the binding partners for the *C*-terminus of the parathyroid hormone receptor (PTHr) and thromboxane A₂ receptor (TP) were searched for using yeast two-hybrid screening, and the functions of these proteins were investigated. We identified *t*-complex testis expressed-1 (Tctex-1) and 4.1G as associated proteins for the PTHr. Tctex-1 is one of the light chains of cytoplasmic dynein, which is a motor protein across microtubules. We found that Tctex-1 was involved in agonist-induced internalization of the PTHr. 4.1G, a cytoskeletal protein, facilitated the cell surface localization of the PTHr and augmented PTHr-mediated signal transduction. TP consists of two splicing variants, TP α and TP β . As a result of yeast two-hybrid screening, two proteasomal proteins, proteasome activator PA28 γ and proteasome subunit α 7, were identified as direct interacting proteins for TP β . TP β has a tendency to be retained in the intracellular compartment, probably due to its binding to proteasomes. We also demonstrated that TP α and TP β formed heterodimers, and the signal transduction through TP α was reduced by the formation of heterodimers. In conclusion, the proteins bound to GPCRs may regulate the intracellular traffic of GPCRs.

Key words—G protein-coupled receptors; carboxy-terminus; intracellular proteins

1. はじめに

細胞膜に局在する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は細胞外からの刺激を受け取ると、その受容体に特異的な三量体 G タンパク質を活性化し細胞内にシグナルを伝達する。三量体 G タンパク質には G_s, G_i, G_q 及び G₁₂ ファミリーの G タンパク質が知られているが、この GPCR を介するシグナル伝達は細胞内の種々のタンパク質によって調節されることが最近明らかにされつつある。例えば、regulator of G protein-signaling (RGS) は、GTPase activating protein としての活性を持ち、活性化した G タンパク質 (GTP 結合体) を速やかに不活性化

の GDP 結合型へ変換させる抑制調節を担っている。¹⁻³⁾

さらに、GPCR のカルボキシル (C) 末端に会合する細胞内タンパク質による GPCR の細胞内局在変化が報告されている。そのよく知られているものにアレスチンがある。⁴⁾ GPCR にアゴニストが結合すると GPCR の立体構造が変化し、三量体 G タンパク質の GDP/GTP 交換が促進されることで細胞内にシグナルが伝達される。一方で、立体構造の変化した GPCR には G protein-coupled receptor kinase (GRK) がリクルートされる。GPCR の C 末端は GRK によってリン酸化されるが、次に、アレスチンがそのリン酸化部位に会合する。その結果、GPCR から三量体 G タンパク質が解離し、シグナル伝達が終了する。⁴⁾ また、アレスチンの会合した GPCR は細胞内内在化 (インターナリゼーション) することも知られている。インターナリゼーション

^a東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野、^b東北大学 21 世紀 COE プログラム “CRESCENDO” (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

*e-mail: nakahata@mail.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S21 で発表したものを中心に記述したものである。

の結果、細胞表面の GPCR 量が減少するため、この反応は脱感作反応の一環であると考えられる。しかし最近になって、GPCR がアレスチンを介してインターナリゼーションすることによって生み出されるシグナル伝達の存在も報告された。⁴⁾ 現在では GPCR の C 末端に会合するタンパク質には、GRK /アレスチン以外にも多くのタンパク質が存在すると考えられているが (Table 1), その機能については十分には解明されていない。そこでわれわれは、副甲状腺ホルモン受容体 (PTHR) とトロンボキサン A₂ (TXA₂) 受容体 (TP) の C 末端に会合するタンパク質を酵母ツーハイブリッド系を用いて探索し、そのタンパク質の機能解析を試みた。本稿では、われわれの最近の知見を中心に紹介する。

2. PTH 受容体 (PTHR)

PTH は血中 Ca²⁺ 濃度の低下時に副甲状腺から放出され、破骨細胞や腎臓の PTHR に作用して骨吸収増加や Ca²⁺ 再吸収促進を引き起こす。その異常として、副甲状腺機能亢進症あるいは低下症などの PTH 関連疾患も知られている。PTH が作用する受容体には 1 型 (PTH1R) と 2 型 (PTH2R) があるが、PTH1R と PTH2R はともに GPCR のクラス II に分類されており、PTH 刺激によって細胞内 cAMP 濃度上昇と [Ca²⁺]_i 上昇が引き起こされる。⁵⁾ PTH1R と PTH2R では結合するリガンドに相違があり、PTH 類似タンパク質 (PTHrP) は PTH1R と結合することはできるが PTH2R とは結合することができず、⁵⁾ 一方、tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) は PTH2R とは結合することができるが PTH1R とは結合することができない。⁶⁾ リガンド刺激後の受容体活性制御メカニズムについては、PTH2R に比べ PTH1R の制御機構がよく研究されている。すなわち、PTH1R はリガンド結合後 GRK2 によってリン酸化され、⁷⁾ さらに、そのリン酸化部位をアレスチンが認識してインターナリゼーションが起こる。⁸⁾ なお、インターナリゼーションした PTHR が細胞膜にリサイクリングするときにはアレスチンは不要である。⁹⁾ また、PTHR がインターナリゼーションすることで ERK1/2 活性化のシグナルの一部が生み出される。^{10,11)} さて、われわれは PTH1R の C 末端に会合するタンパク質を酵母ツーハイブリッド系によって探索したが、その結果 Tctex-1 (*t*-complex testis ex-

pressed-1) と 4.1G が見出された。そこで、PTHR 機能に対するこれら 2 つのタンパク質の影響について検討を加えた。

2-1. PTHR 機能に対する Tctex-1 の影響

Tctex-1 は最初に精巣 (精子) で見出された 17 番染色体にコードされるタンパク質で、ダイニン複合体の一部を構成するタンパク質である。ダイニンは細胞質ダイニンと鞭毛ダイニンからなるが、そのうち細胞質ダイニンは小胞などの細胞内物質を微小管に沿ってマイナス末端方向へ輸送することに関与するモータータンパク質であり、¹²⁾ 特に神経細胞軸索においては、小胞の逆行輸送に関与することが知られている。¹²⁾

ダイニンは種々のタンパク質から構成されている複合体であるが、これらタンパク質は分子の大きさにより次のように分類されている。すなわち、ATPase 活性や微小管モーター活性を有する球状の 2 つの重鎖 (—520 kDa), 単一な 2 つあるいは 3 つの中間鎖 (74 kDa),¹³⁾ 4 つの軽中間鎖 (50—60 kDa)¹⁴⁾ と、1 つあるいはそれ以上の軽鎖 (—22 kDa)¹⁵⁾ である。また、Tctex-1 は細胞質ダイニン¹⁶⁾ と鞭毛ダイニン¹⁷⁾ の軽鎖であることがそれぞれ報告されている。さて、現在までにいくつかのタンパク質が Tctex-1 と結合することが知られている。細胞膜受容体としては光受容体の GPCR であるロドプシン、チロシンキナーゼ型のニューロトロフィン受容体 TrkA, B, C 受容体や、ポリオウイルス受容体 CD155 が知られている。例えばロドプシンの場合、Tctex-1 が微小管に沿ったロドプシンの細胞内輸送に関与すること¹⁸⁾ や、MDCK 細胞に強制発現したロドプシンが Tctex-1 によってアピカル側へ局在するようになること¹⁹⁾ が報告されている。Trk 受容体の場合では、ニューロトロフィン刺激後、神経細胞軸索における Trk 受容体の逆行輸送に Tctex-1 が関与すること²⁰⁾ や、CD155 では末梢神経にポリオウ



中畑則道

東北大学大学院薬学研究科教授 (細胞情報薬学分野)。1951 年北海道生まれ。1974 年北海道大学薬学部卒業。1974 年福島県立医科大学助手。1980 年薬学博士 (北海道大学)。1984 年米国ノースカロライナ大学研究員。1988 年福島県立医科大学助教授 (薬理学講座)。1991 年第 6 回日本薬理学会学術奨励賞受賞。1992 年東北大学薬学部助教授 (生物薬品製造学講座)。1999 年より現職。趣味：水泳、テニス、ゴルフ、読書。

Table 1. Intracellular Proteins Interacted with C-terminus of GPCR

| Intracellular proteins | GPCRs (references) |
|-------------------------|--|
| 14-3-3 | PTH1 (<i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 1620 , 32 (2003).) |
| 4.1G | PTH1 (<i>Biochem. J.</i> , 392 , 75 (2006).) |
| AKAP-250 | β_2 (<i>J. Biol. Chem.</i> , 276 , 24005 (2001).) |
| ARF4 | Rhodopsin (<i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 102 , 3301 (2005).) |
| ARIP/MAGI-2 | 5-HT _{2A,2C} (<i>J. Biol. Chem.</i> , 279 , 20257 (2004).) β_1 (<i>J. Biol. Chem.</i> , 276 , 41310 (2001).) |
| CREB2(ATF4)/ATFx | GABA _{B1/B2} (<i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 97 , 13967 (2000).) |
| ATRAPP | AT ₁ (<i>J. Biol. Chem.</i> , 274 , 17058 (1999).) |
| ATIP | AT ₂ (<i>J. Biol. Chem.</i> , 279 , 28989 (2004).) |
| CIPP | 5-HT _{2A} (<i>J. Biol. Chem.</i> , 279 , 20257 (2004).) |
| CLIC6 | D ₂ , D ₃ , D ₄ (<i>Brain Res. Mol. Brain Res.</i> , 117 , 47 (2003).) |
| COPI | D ₁ (<i>Eur. J. Cell Biol.</i> , 81 , 77 (2002).) |
| Dishevelled | Frizzled (<i>Dev. Dyn.</i> , 218 , 671 (2000).) |
| Dlgh3/MPP-3 | 5-HT _{2C} (<i>J. Biol. Chem.</i> , 279 , 20257 (2004).) |
| DRIP78 | D ₁ (<i>Nat. Cell Biol.</i> , 3 , 492 (2001).) |
| eNOS | AT ₁ , B ₂ , ET _B (<i>Biochem. J.</i> , 343 , 335 (1999).) |
| Filamin A | mGlu _{4a,5a,5b,7a,7b,8a} (<i>FEBS Lett.</i> , 514 , 184 (2002).) μ (<i>Mol. Pharmacol.</i> , 64 , 1092 (2003).) |
| G β γ /CaM | mGlu _{7a,7b} (<i>Science</i> , 286 , 1180 (1999).) |
| GIPC | D ₂ , D ₃ (<i>Mol. Biol. Cell</i> , 15 , 4926 (2004).) β_1 (<i>J. Biol. Chem.</i> , 278 , 26295 (2003).) |
| Homers1, 3 | mGlu _{1a,5a} (<i>Nature</i> , 411 , 962 (2000); <i>Mol. Cell. Neurosci.</i> , 20 , 323 (2002).) |
| JAK2 | AT ₁ (<i>J. Biol. Chem.</i> , 272 , 23382 (1997).) |
| NCS-1 | D ₂ (<i>J. Neurosci.</i> , 22 , 8476 (2002).) |
| NEHRF/EBP50 | β_2 (<i>Nature</i> , 401 , 286 (1999).) P2Y ₁ (<i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> , 95 , 8496 (1998).) κ (<i>J. Biol. Chem.</i> , 279 , 25002 (2004).) PTH1 (<i>J. Peptide Res.</i> , 65 , 411 (2005).) |
| Periplakin | μ (<i>J. Biol. Chem.</i> , 278 , 33400 (2003).) |
| PICK-1 | mGlu _{7a,7b} (<i>J. Neurosci.</i> , 20 , 7252 (2000); <i>Biochem. J.</i> , 372 , 183 (2003).) |
| PLZF | AT ₂ (<i>EMBO J.</i> , 22 , 6471 (2003).) |
| PSD-95 | 5-HT _{2A,2C} (<i>J. Biol. Chem.</i> , 279 , 20257 (2004).) β_1 (<i>J. Biol. Chem.</i> , 279 , 20257 (2004).) |
| SAP97 | 5-HT _{2A,2C} (<i>J. Biol. Chem.</i> , 279 , 20257 (2004).) |
| SAP102 | 5-HT _{2C} (<i>J. Biol. Chem.</i> , 279 , 20257 (2004).) |
| Shank1 | CL1 (<i>J. Biol. Chem.</i> , 275 , 36204 (2000).) |
| Siah1A | mGlu _{1a,5} (<i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 95 , 8496 (1998).) |
| Src | β_3 (<i>J. Biol. Chem.</i> , 275 , 38131 (2000).) |
| Syntenin | mGlu _{7a,7b} (<i>Biochem. J.</i> , 372 , 183 (2003).) |
| Tamalin | mGlu _{1a} (<i>J. Neurosci.</i> , 22 , 1280 (2002).) |
| Tctex-1 | PTH1 (<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 311 , 24 (2003).) |
| Veli-3 | 5-HT _{2C} (<i>J. Biol. Chem.</i> , 279 , 20257 (2004).) |

イルスが感染すると、Tctex-1 が神経細胞軸索を通じてポリオウイルスを脊髄に逆行輸送し、その結果ポリオウイルスの病原性に関与すること^{21,22)}等が示されている。

このような背景からわれわれは、Tctex-1 の PTHR 機能に対する影響を検討した。²³⁾ 初めに、

Tctex-1 との結合に関与する PTHR-C 中のアミノ酸は N 末側の 4 アミノ酸 K486, R488, V500, S501 であることを見出した。これら 4 アミノ酸をすべてアラニンに置換した変異体 PTHR-KRVS は、Tctex-1 と結合しなくなった。次に、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を C 末端に融合した PTHR (PTHR-GFP)

を作製し、PTH-(1-34) 100 nM 刺激後に PTHR-GFP の細胞内局在への影響を検討したところ、刺激 30 分後には核周辺部へのインターナリゼーションが認められた (Fig. 1(A) a, b). また、微小管脱重合薬ノコダゾール (10 μ M) は、PTHR-GFP を早期エンドゾームあるいは細胞膜に留め、核周辺部への移行を阻止した (Fig. 1(A) c, d). これらのことから、PTHR は微小管依存的にインターナリゼーションすることが示唆された。また、GFP を融合した野生型の PTHR (PTHR-wt) と PTHR-KRVS を PTH-(1-34) で刺激したところ、PTHR-wt は核周辺部までインターナリゼーションしたのに対し、PTHR-KRVS は多くが細胞膜に残存していた。さらに、PTHR-wt と PTHR-KRVS のイン

ターナリゼーション量を細胞表面ビオチン化法によって検討したところ、PTHR-KRVS は PTHR-wt に比べて細胞内移行した量が顕著に減少していた (Fig. 1(B)). 以上の結果より、PTHR は C 末端領域で Tctex-1 と直接会合し、Tctex-1 はアゴニスト依存的なインターナリゼーションに介在することが示唆された。

従来、細胞膜直下における細胞骨格系タンパク質の役割においては、Apodaca²⁴⁾ や Cavalli ら²⁵⁾ がその総説中で述べているように、アクチンフィラメントが中心的な役割を担うものと考えられている。しかし、われわれのノコダゾール処理あるいは PTHR-KRVS を用いた実験結果では、アゴニスト刺激後も細胞膜に留まっている PTHR が観察された。このことは、微小管あるいは Tctex-1 が PTHR のインターナリゼーションの初期段階から重要な役割を担うことを示している。Hestermann ら²⁶⁾ はその総説中で、間期の細胞ではダイニンやダイナクチンを介して微小管が細胞膜と会合すると述べている。一方 Ligon らは、²⁷⁾ 上皮細胞において Tctex-1 は細胞-細胞接着面に局在しており、その局在はノコダゾール処理では変化はみられないが、アクチン脱重合薬ラトランクリン B で処理すると細胞質中へ劇的に局在変化することを報告している。このことより、細胞質ダイニンは状況によっては微小管ではなく、アクチンフィラメントに依存して細胞内物質輸送を行う場合もあることが示唆される。²⁷⁾ 以上のことを考え合わせると、Tctex-1 並びに細胞質ダイニンが PTHR のインターナリゼーションを引き起こすには、細胞膜に局在している PTHR に Tctex-1 が直接会合することが最初のステップであると考えられた。²³⁾

今後、Tctex-1 が PTHR のシグナル伝達をどのように制御しているのかを分子レベルで検討するためには、Tctex-1 会合タンパク質を同定し、その機能解析をすることが必要である。

2-2. PTHR 機能に対する 4.1G の影響

4.1G は protein 4.1 ファミリーの一つである。Protein 4.1 は細胞膜の裏側に豊富に存在し、スペクトリン/アクチン細胞骨格系と会合して細胞膜の安定化、形態維持や細胞膜の変形に関与するほか、膜タンパク質の細胞膜への固定化にも関与する。²⁸⁾ Protein 4.1 にはいくつかのファミリーが知られているが、

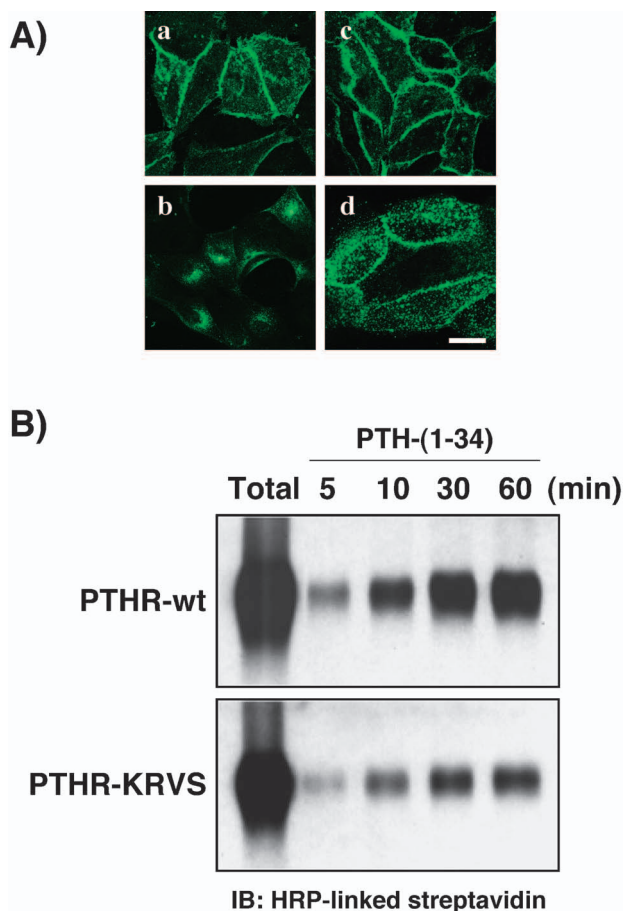


Fig. 1. Effect of Tctex-1 on Internalization of PTHR

(A) Role of microtubule in GFP-fused PTHR. PTHR-GFP expressed MDCK cells were preincubated without (c) or with (d) 10 μ M nocodazole for 60 min, following to treatment of control (a, c) or 100 nM PTH-(1-34) (c, d) for 30 min. Scale bar: 20 μ m. (B) Comparison of internalization between PTHR-wt and -KRVS by surface biotinylation assay. Total: the amount of PTHR on cell surface in control. 5, 10, 30, 60: the amount of intracellular PTHR after treatment with 100 nM PTH-(1-34) for indicated time.

最初に発見された protein 4.1 は赤血球に豊富に存在する 4.1R (red-blood-cell-type) である。現在までに 4.1B (brain-type),²⁹⁾ 4.1G (general-type),³⁰⁾ 4.1N (neuron-type)³¹⁾ と 4.1O (ovary-type)³²⁾ が同定されている。

Protein 4.1 ファミリーは、FERM (4.1-ezrin-radixin-moesin) ドメイン、スペクトリン/アクチン-結合ドメイン (SABD) 及び C 末端ドメイン (CTD) より構成されている。³³⁾ FERM ドメインは 4.1, ezrin, radixin, moesin という、働きの類似したタンパク質間によく保存されたドメインである。³⁴⁾ Protein 4.1 は、ATP, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate や phosphatidylserine などのリン脂質、calmodulin や p55 などの細胞内タンパク質、glycophorin A, glycophorin C, band 3 や CD44 などの膜タンパク質³⁴⁾のほか、最近では $\alpha\beta8$ インテグリン³⁵⁾とも会合することが知られている。Protein 4.1 ファミリーはまた、いくつかの GPCR 及びイオンチャネルとも会合することが知られている。すなわち、AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 受容体である GluR1³⁶⁾ や GluRD (GluR4),³⁷⁾ ドパミン D₂ 及び D₃ 受容体,³⁸⁾ そして A₁ アデノシン受容体 (A₁AR)³⁹⁾ がそれぞれ報告されている。また、細胞内 Ca²⁺ チャネルである inositol 1,4,5-trisphosphate 受容体 (IP₃R) にも protein 4.1 の会合することが報告されている。⁴⁰⁾ Protein 4.1 はこれらの受容体に対して同じような作用、すなわち、受容体の細胞膜への局在化に関与すると考えられる。また IP₃R に関してはそれ以外にも、神経細胞における IP₃R 軸索内拡散を抑制することが報告されている。⁴¹⁾ しかし、肝細胞においては IP₃R が protein 4.1 と会合しないという報告もあり、⁴²⁾ 細胞特異性も示唆される。一方、A₁AR³⁹⁾ や代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1 α)⁴³⁾ はともに三量体 G タンパク質 G_i 共役型の GPCR であるが、protein 4.1 はこれらの受容体のシグナル伝達を抑制することが報告されている。

PTHR においては、protein 4.1 ファミリーのうち 4.1G が会合することは前述した通りである。COS-7 細胞に PTHR-GFP と FLAG-tag を付けた 4.1G とを共発現し、細胞内局在を免疫染色法にて検討したところ、両者は細胞膜及び細胞質で共局在していることが示された。さて、PTHR-C に結合

するタンパク質として、酵母ツーハイブリッド系の実験で当初見出された 4.1G は、全長ではなく CTD 部分であった。4.1G の CTD 部分フラグメント (4.1G-CTD) は PTHR と結合することができるが、FERM ドメインや SABD を有していないために細胞膜と会合せず、4.1G の不活性化体として実験的に利用可能である。そこで、PTHR の細胞膜局在量に対する 4.1G の影響を細胞表面ビオチン化法で検討したところ、全長の 4.1G によって PTHR の細胞膜局在量は顕著に増強したが、4.1G-CTD では PTHR の細胞膜局在に変化は起こらなかった (Fig. 2(A)). すなわち、PTHR が細胞膜に安定的に局在することに 4.1G の関与が見出された。このことは、他の GPCR やイオンチャネルに対する protein 4.1 の作用と同様の結果が得られたものと考えられる。さらに、PTHR のシグナル伝達に対して 4.1G が与える影響について、[Ca²⁺]_i 上昇 (Fig. 2(B)) 及び extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) リン酸化で検討した。その結果、4.1G 依存的、4.1G-CTD 非依存的な PTHR シグナルの有意な増強がみられた。すなわち、4.1G によって PTHR が細胞膜に安定的に留まることができるため、そのシグナル伝達も増強 (生理的には安定化か?) される可能性が考えられた。⁴⁴⁾ しかし、この PTHR での結果は、A₁AR や mGluR1 α のシグナル伝達が protein 4.1 によって抑制されたとする結果とは相反するものであった。PTHR は三量体 G タンパク質 G_s と G_q に主に共役している一方で、A₁AR や mGluR1 α は G_i に共役していることから、G_s/G_q と G_i の共役 GPCR は、細胞内タンパク質による制御メカニズムが異なっている可能性も考えられるが、現在のところ、明確な理由は明らかではない。

さて、protein 4.1 は細胞膜裏打ちタンパク質であるが、常に細胞膜に会合している訳ではなく、細胞膜に結合と解離を繰り返すと考えられている。すなわち、protein 4.1 と類似タンパク質である ezrin, radixin と moesin は、リン酸化されると N 末側と C 末側の分子内結合が解離し、細胞膜及び膜タンパク質に結合することが知られている。⁴⁵⁾ また Manno ら⁴⁶⁾ は、4.1R の Ser312 が protein kinase C (PKC) の活性化薬によってリン酸化され、このリン酸化が 4.1R が細胞膜から遊離することに関与す

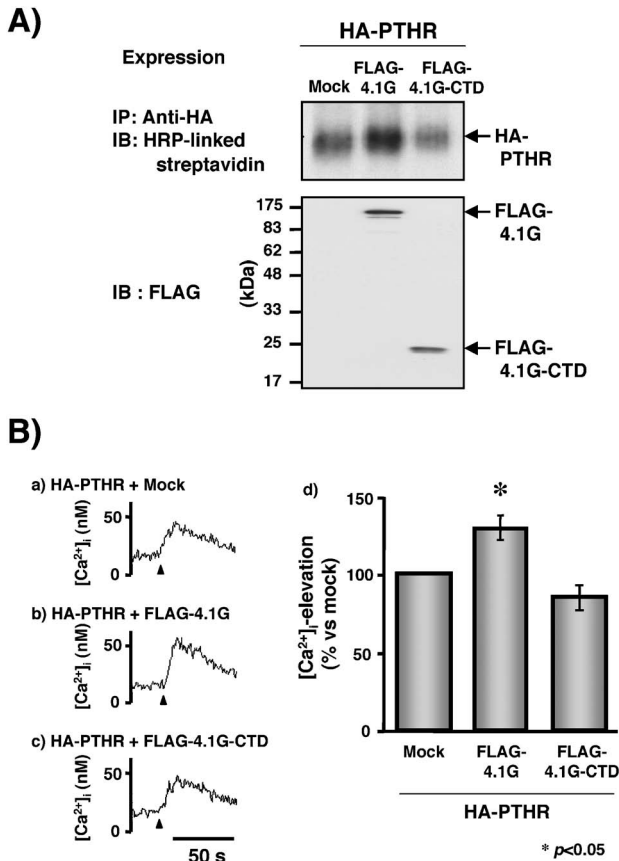


Fig. 2. Effect of 4.1G on Cell Surface Localization of PTHR and PTH-mediated $[Ca^{2+}]_i$ Elevation

(A) Effect of 4.1G on the amount of cell surface PTHR. HA-PTH and flag-4.1G (4.1G or 4.1G-CTD) were co-expressed in COS-7 cells. The amount of cell surface PTHR was measured by surface biotinylation assay (upper). The expressed 4.1G and 4.1G-CTD were detected by anti-FLAG M2 antibody (lower). (B) Role of 4.1G in PTHR-mediated $[Ca^{2+}]_i$ elevation. $[Ca^{2+}]_i$ was monitored by the fura 2 method. $[Ca^{2+}]_i$ elevation induced by 100 nM PTH-(1-34) was measured in the cells expressing HA-PTH and FLAG-mock (a), HA-PTH and FLAG-4.1G (b) and HA-PTH and FLAG-4.1G-CTD (c). The quantified data are shown in right panel. Data are the mean \pm S.E. ($n=6$). Significant difference from Mock ($*p < 0.05$).

ることを報告している。しかし、protein 4.1 の生理的意義については未解明の部分が多く残されており、今後、protein 4.1 による GPCR シグナルの分子制御メカニズムの解明が期待される。

以上のように、PTHR の C 末端に会合するタンパク質として Tctex-1 と 4.1G を見出し、それらが PTHR の細胞内分布を変化させることによりその機能を調節することを示した (Fig. 3)。Tctex-1 と 4.1G は、PTHR に会合するタンパク質全体のうちの一部に過ぎず、今後、さらなる新規タンパク質が見出され、それらの PTHR 機能制御機構が明らかになることが望まれる。さらに、それらタンパク質の機能の解明は、PTHR のみならず多くの GPCR

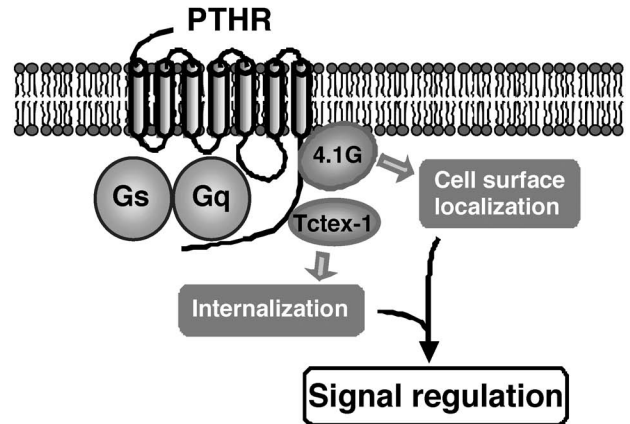


Fig. 3. Roles of 4.1G and Tctex-1 in the Regulation of PTHR-mediated Signaling

の機能制御機構を明らかにすることにつながるものと考えられる。

3. TXA₂ 受容体 (TP)

TXA₂ はアラキドン酸代謝物の 1 つであり、血管及び気管支平滑筋の収縮、血管平滑筋の増殖、血小板の凝集等を引き起こす。⁴⁷⁾ その受容体はアストロサイトを中心とするグリア細胞にも存在して、脳機能調節にも係わる^{48,49)} とともに、近年、TP ノックアウトマウスを用いた結果では外来抗原に対する免疫応答の増強がみられ、TXA₂ の免疫系における役割が示唆されている。⁵⁰⁾ これら TXA₂ による生体応答は TXA₂ が特異的に結合する TXA₂ 受容体 TP を介して引き起こされる。TP は G タンパク質連関型受容体 (GPCR) の 1 つであり、主として G_{q/11} と共役してホスホリパーゼ C の活性化を引き起こし、その結果、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇やプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化がもたらされる。⁵¹⁻⁵³⁾ TP は G_{q/11} に加えて G₁₂, G₁₃, G_i 及び G_h とも共役することが報告されており、⁵⁴⁻⁵⁶⁾ 様々なシグナル経路を活性化させる。

ヒト TP には多くの他の GPCR と同様にスプライシングバリエーションが存在する。その 1 つの TP α はヒト胎盤から初めてクローニングされたことから placental type と呼ばれ、343 アミノ酸をコードしている。⁵⁷⁾ 一方、TP β はヒト内皮細胞から初めてクローニングされたことから endothelial type と呼ばれ、407 アミノ酸をコードしている。⁵⁸⁾ TP α と TP β は N 末からの 328 アミノ酸は共通であり、C 末端部分の配列のみが異なっている。すなわち、TP α 及び TP β は細胞外の N 末から 7 回目の膜貫通

領域まで同一であることから、両受容体のリガンド結合部位は同じであると予想されており、⁵⁹⁾ 実際にはリガンドに対する親和性は $TP\alpha$ と $TP\beta$ で同様であることが報告されている。^{53,60,61)} $TP\alpha$ と $TP\beta$ は発見当初は組織特異的なものと考えられたが、その後の研究から多くのヒト細胞や組織において同時に発現していることが示されている。⁶²⁾

$TP\alpha$ と $TP\beta$ の差は C 末端部分のアミノ酸配列のみであるが、両スプライシングバリエントの機能的差異についてはいくつか報告がある。⁴⁷⁾ 一般的に、GPCR の細胞内第三ループ及び C 末端ドメインは三量体 G タンパク質との会合に関与し、その部分のリン酸化は脱感作に重要であると言われている。⁶³⁾ 例えば、ラット pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) 受容体には、細胞内第三ループにある種のアミノ酸配列が挿入されているスプライシングバリエントが存在する。このバリエントはアデニル酸シクラーゼ及びホスホリパーゼ C の活性化において異なる反応を示す。⁶⁴⁾ また、prostaglandin E_2 が作用する EP3 受容体のスプライシングバリエントは異なる C 末端ドメイン配列を有し、それぞれ異なる G タンパク質と共役し、異なるセカンドメッセンジャーシステムを活性化する。⁶⁵⁾ したがって、C 末端ドメインの配列が異なる $TP\alpha$ と $TP\beta$ は、異なる G タンパク質を介したシグナル伝達系を活性化することや、受容体の脱感作反応がそれぞれ異なることが考えられる。Hirata ら⁵³⁾ は $TP\alpha$ を発現させた Chinese hamster ovary (CHO) 細胞において、 TP アゴニスト I-BOP は細胞内 cAMP の上昇をもたらすが、 $TP\beta$ を発現させた CHO 細胞では cAMP 上昇が起こらなかったと報告している。また、このとき $TP\alpha$ 及び $TP\beta$ を発現させた CHO 細胞において、I-BOP は同程度のホスファチジルイノシトール水解反応を起こした。この事実は、 $TP\alpha$ と $TP\beta$ が異なる G タンパク質と共役することを示唆している。われわれも、ERK リン酸化のパターンに $TP\alpha$ と $TP\beta$ で相違のあることを示しているが、⁶⁶⁾ その分子メカニズムは十分には解明されていない。

われわれは、 $TP\alpha$ と $TP\beta$ の機能的差異をもたらす要因として、C 末に会合する何らかのタンパク質の存在を考え、酵母ツーハイブリッド系によりそれらの会合タンパク質の同定を試みた。その結果、

$TP\beta$ C 末部に会合するタンパク質として、proteasome subunit $\alpha 7$ (PSMA3 あるいは C1/PRS1) 及び proteasome activator 28 γ (PA28 γ , Ki antigen あるいは PSME3) が見出された。そこで、それら会合タンパク質が TP の機能に与える影響について検討した。

3-1. $\alpha 7$ と PA28 γ プロテアソームはタンパク質分解に係わる巨大なタンパク質複合体であり、⁶⁷⁾ 細胞内では核及び細胞質内に局在する。その基本ユニットとして、プロテアーゼ作用を持つ 20S プロテアソームが存在する。これは 28 個のサブユニットからなり、 α 及び β が各々 7 個のサブユニットからなる α リング及び β リングが $\alpha\beta\beta\alpha$ の順番で円筒型に積み重なった構造をとる (Fig. 4)。タンパク質分解における触媒部位は β リングの内側に存在するが、円筒の両端は普段は閉じた状態にあり、プロテアソームアクティベーターが円筒の両端に結合し、その端を開口させることにより活性型プロテアソームとなる。 $TP\beta$ C 末部に会合するタンパク質として見出された $\alpha 7$ はこの α リングを構成するサブユニットの 1 つである。

プロテアソームアクティベーターには大きく分けて PA700 (19S regulator) 及び PA28 (REG, 11S

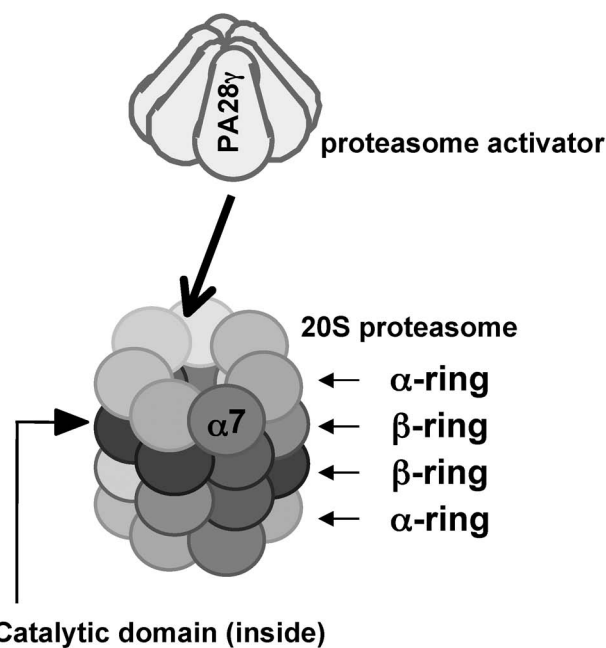


Fig. 4. Structure of Proteasome

The 20S proteasome consists of 28 subunits arranged as four rings of seven subunits. 20S proteasome binds to PA700 (19S regulator, not shown) or PA28 (11S regulator) to degrade proteins.

regulator とも呼ばれる) の 2 種類が存在する (Fig. 4). PA700 は約 20 種類のサブユニットから構成され, その 20S プロテアソームに結合したものは 26S プロテアソームと呼ばれ, いわゆるユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解に関与する. 一方, もう 1 つのプロテアソームアクティベーターである PA28 は, ATP 非依存的に 20S プロテアソーム活性化を引き起こし, 活性化されるペプチダーゼ活性は低く, 例えば IFN- γ に誘導されて MHC クラス I 分子への抗原提示の過程で抗原を切り出す役割を担っていると考えられている.⁶⁸⁾ PA28 は PA28 α , PA28 β と PA28 γ に分類され, PA28 α 及び PA28 β は 50% の同一性を持つのに対し, TP β と直接会合することが明らかになった PA28 γ は, PA28 α や PA28 β との相同性は低い.

細胞内での局在については一般に PA28 α/β は細胞質内に,⁶⁹⁾ PA28 γ は核内及び細胞質に存在することが報告されている.⁷⁰⁻⁷³⁾ 組織分布についてはいずれも全身に存在するが, PA28 α は心臓, 脾臓, 肺, 及び胸腺に多く, PA28 β は脾臓, 肺及び胸腺に多い. また, PA28 γ は脾臓, 胸腺及び精巣に多い.⁷⁴⁾

PA28 α/β は IFN- γ により強く誘導されることから, その機能として前述の抗原提示に関与することが考えられる. 一方, PA28 γ に関しては, 細胞増殖への関与が示唆される⁷³⁾ものの, 現在のところその機能ははっきりとしていない.

3-2. TP 機能に対するプロテアソームの影響

始めに, 共免疫沈降法及び *in vitro* pull-down 法を行ったところ, $\alpha 7$ 及び PA28 γ が TP β と細胞内で直接会合することが確認された. 次に, TP α 及び TP β の発現量がプロテアソーム阻害薬によりどのような影響を受けるかをウェスタンブロッティング法により検討した結果, プロテアソーム阻害薬 MG-132 を作用させた細胞における TP β 発現量は, 作用させなかった細胞に比べて顕著に多かった. 一方, TP α 発現量はプロテアソーム阻害薬による変化を受けなかった. また, MG-132 存在下では TP β が高度にユビキチン化されていた. このことから, TP β は恒常的にユビキチン-プロテアソーム系により分解されていることが示唆された.

このユビキチン-プロテアソーム系が細胞膜表面上の TP 発現量の違いをもたらすのかどうか, 新た

なタンパク質合成を阻害する cycloheximide 存在下に TP アンタゴニスト [³H]SQ29548 の細胞表面の結合量を測定した. その結果, プロテアソーム阻害薬により細胞膜表面の TP β 数が増加した. 一方, 細胞膜表面の TP α 数はプロテアソーム阻害薬により増加せず, 逆に減少する傾向がみられた. 一過性に発現させたときの細胞表面の TP 発現レベルは, TP α 発現細胞では TP β 発現細胞の約 5 倍の受容体数を示した. また, U46619 は濃度依存的にホスホリパーゼ C を活性化するが, この作用は TP α 発現細胞において TP β 発現細胞の約 4 倍多かった. したがって, 通常 TP α は細胞膜表面に局在するものの, TP β は細胞内部に局在する傾向があることが示唆された. その理由として, TP β はプロテアソーム関連タンパク質と会合し, プロテアソームによって恒常的に分解される結果, 細胞膜表面における TP β の発現量は TP α に比べ低くなることが考えられた.⁷⁵⁾

以上のように, TP α と TP β の機能的相違をその会合タンパク質から解析したところ, TP β がプロテアソーム関連タンパク質と会合して分解を受けやすく, 2 つの受容体の細胞内トラフィックが異なることが明らかになった. 今後, プロテアソームによる TP 機能制御の詳細なメカニズムを解明することにより, TXA₂ による細胞応答の理解がさらに深まることが期待される.

3-3. ホモ・ヘテロ二量体形成による TP 機能の制御機構 近年, 様々な GPCR のホモ及びヘテロ二量体形成が報告されている.⁷⁶⁾ これらは細胞内において実際に会合しているのかどうか疑問視する声も多かったが, FRET (fluorescence resonance energy transfer) 等の技術の発展により, ホモあるいはヘテロ二量体化が実際に生きた細胞内で起こることが証明され, 二量体形成によるシグナルの複雑化が知られるようになった. それぞれの GPCR がどのような相手と二量体を形成し, この二量体形成により下流のシグナルにどのような影響が及ぼされるのかについて, 現在, 手探りながら研究が進められている. しかし, TP に関してはホモ及びヘテロ二量体に関する報告は今までになされていない. そこで, TP α と TP β がホモあるいはヘテロ二量体を形成するか否か, また形成するとすれば前述の TP β へのプロテアソーム関連タンパク質との会合

とどのような関連があるのかを明らかにすることを目的として実験を行った。⁷⁷⁾

最初に、免疫沈降法を用いた解析の結果、TP α とTP α 、TP β とTP β のホモで、TP α とTP β のヘテロで二量体を形成することが明らかになった (Fig. 5). 二量体形成時のシグナル伝達の変化を検討したところ、TP α とTP β を同時に発現させるとTP α を単独発現した場合よりもTP アゴニストU46619に対するイノシトールリン脂質水解反応の減弱が認められた (Fig. 6).

このシグナル伝達の減弱は細胞表面における受容体の数の減少によることが考えられる. そこで、TP α 、TP β 、あるいはTP α とTP β を同時に発現させたCHO細胞の膜サンプルを用いて³H]SQ29548結合実験を行ったところ、その結合部位数はTP α 発現細胞で最も多く、ついでTP α とTP β を同時に発現させた細胞、TP β 発現細胞の順であった。⁷⁷⁾ このことから、TP α とTP β を同時に発現させた場合のシグナル伝達の減弱は、細胞膜上での受容体の発現の減少によるものであることが示唆された. これは、TP β がプロテアソーム関連タンパク質と会合して、細胞内に局在し易いため、TP α とTP β の二量体がTP α に比べて細胞膜へ移行しづらくなっていることを示している.

さて、GPCRの二量体形成が細胞内のどこで起こるかについては生理的な意義を考える上で重要である. 二量体形成は形質膜において、あるいはタンパク質合成の品質管理を担うER⁷⁸⁾等の細胞内オルガネラにおいて起こることが考えられる. TPはN末部にN-glycosylation部位を持つことが報告されており、この糖鎖修飾はTPの細胞表面発現に必須であることが言われている。⁷⁹⁾ 糖鎖修飾を受けたTP α 及びTP β はSDS-PAGE上で分子量が55–70 kDaの広いバンドを示し、糖鎖修飾を受けてないTP α 及びTP β はそれぞれ分子量が28及び32.5 kDaのバンドを示す。⁸⁰⁾ 二量体形成して免疫沈降されたタンパク質中には糖鎖修飾を受けたTPと糖鎖修飾を受けてないTPの両者が含まれていたが、その主なものは糖鎖修飾を受けてないTPであった (Fig. 5). すなわち、TP α 及びTP β のヘテロ二量体形成は、主として糖鎖修飾以前にERで起こっているものと思われる. そして、プロテアソーム関連タンパク質と会合することにより、細胞内の部位に

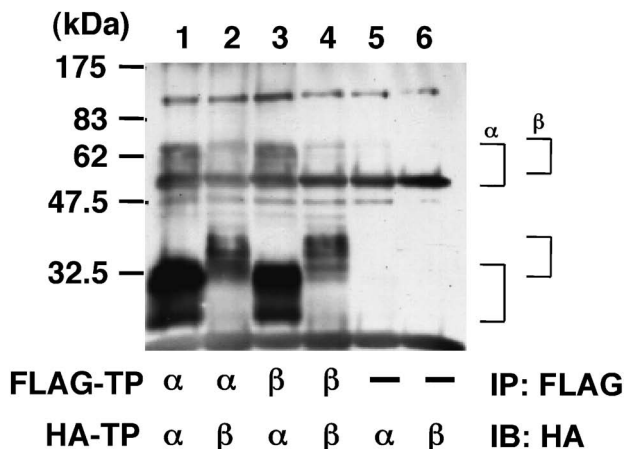


Fig. 5. Co-immunoprecipitation of TP α and TP β

HEK293 cells were transiently co-transfected with FLAG-TP α /HA-TP α (lane 1), FLAG-TP α /HA-TP β (lane 2), FLAG-TP β /HA-TP α (lane 3), FLAG-TP β /HA-TP β (lane 4), vector/HA-TP α (lane 5), vector/HA-TP β (lane 6). Forty-eight h after transfection, the cells were solubilized in lysis buffer and FLAG-TPs were immunoprecipitated with anti-FLAG agarose. Immunoprecipitated proteins were subjected to SDS-PAGE and detected by anti-HA antibody. Figure shows 27–33 kDa (non-glycosylated) and 50–65 kDa (glycosylated) proteins for HA-TP α , and 33–40 kDa (non-glycosylated) and 50–67 kDa (glycosylated) proteins for HA-TP β .

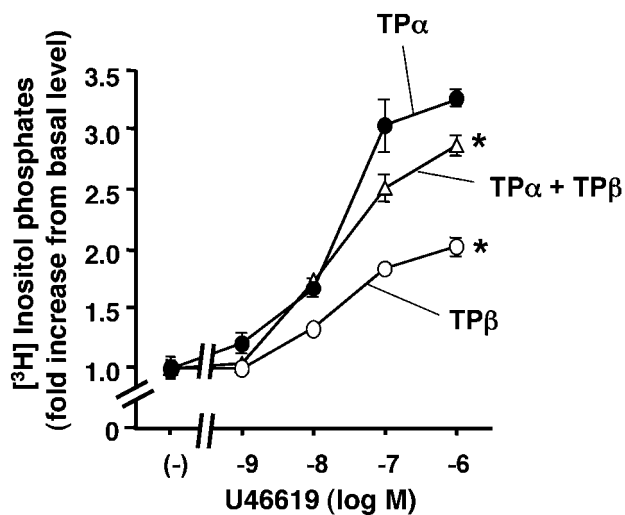


Fig. 6. Effect of Co-expression of TP α and TP β on U46619-induced Phosphoinositide Hydrolysis

CHO cells were transiently expressed with TP α (closed circle) or TP β (open circle) or co-expressed with TP α and TP β (triangle). Forty-eight h after transfection, the cells were stimulated by U46619 for 20 min, and accumulated inositol phosphates were measured. The levels of inositol phosphates are shown as the fold increase above basal, and data are expressed as the mean \pm S.E. ($n=3$). *Significantly different from TP α ($p<0.05$, two-way ANOVA).

留まる傾向を示すTP β は、そのヘテロ二量体形成によりTP α を細胞内に保持する作用を示すことが考えられる. したがって、TP α とTP β の間のヘテロ二量体形成の生理的な役割は、新しく合成されたTPの品質管理と、TPが細胞膜へ移行するのを制

御することによりシグナルの強度を制御することが考えられる。免疫沈降されたタンパク質には TP α と TP β 以外にも何らかのタンパク質が含まれる可能性があり、TP α と TP β が間接的に会合している可能性も否定できない。したがって、TP α と TP β の直接的な会合については分子レベルでの詳細な解析が必要である。

4. おわりに

GPCR のうち、PTHrP 及び TP についてその受容体 C 末に会合するタンパク質を酵母ツーハイブリッド系により探索し、PTHrP については Tctex-1 と 4.1G を、また TP β についてはプロテアソームサブユニット $\alpha 7$ とプロテアソームアクチベーター PA28 γ を見出し、それら会合タンパク質によるそれぞれの GPCR 機能に及ぼす作用について述べてきた。Tctex-1 は PTHrP のインターナリゼーション、4.1G は PTHrP の細胞膜局在の安定化、プロテアソームサブユニット $\alpha 7$ と PA28 γ は TP β タンパク質の細胞内での品質管理に係わり、受容体の細胞膜へのトランスロケーションを制御している可能性が示された。すなわち、GPCR の C 末に会合するタンパク質は GPCR の細胞内局在を調節する因子として機能していることが考えられた。アゴニストが細胞膜表面の GPCR に結合して始めて、GPCR を介するシグナル伝達が作動する。したがって、GPCR の細胞膜表面へのトランスロケーションは生理活性発現に極めて重要であり、その調節機構の一端が GPCR の C 末に会合するタンパク質によって担われていることが示された。本研究では、2 種類の GPCR を用いて検討したが、GPCR の C 末に会合するタンパク質が GPCR 特異的なものかどうかについては、現在のところ十分な解析が行われておらず、今後の研究の進展が期待される。もしも、ある種の GPCR に特異的に会合するタンパク質が存在するとすれば、その受容体の生理機能発現に特異性を与える 1 つのメカニズムになる。一方、GPCR の C 末に会合するタンパク質の種類についても、さらなる研究の進展が望まれている。始めに述べた通り、多くのタンパク質が GPCR の C 末に会合していることが報告されており、今後さらにその種類は増えると思われる。それぞれの会合タンパク質の GPCR 機能に及ぼす生理活性を詳細に解析していくことにより、新しい GPCR 活性調節機構

が明らかになるとともに、それらのタンパク質は、新たな GPCR 機能の調節薬の標的分子になることが考えられる。

謝辞 本研究は東北大学大学院医学系研究科分子薬理学分野の柳澤輝行教授及び助川 淳助教授、同大学院薬学研究科細胞情報薬学分野の佐々木雅子博士の協力によったものであり、ここに厚く感謝致します。

REFERENCES

- 1) Hu G., Wensel T. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 9755–9760 (2002).
- 2) Drenan R. M., Douppnik C. A., Boyle M. P., Muglia L. J., Huettner J. E., Linder M. E., Blumer K. J., *J. Cell Biol.*, **169**, 623–633 (2005).
- 3) Ishii M., Kurachi Y., *Life Sci.*, **74**, 163–171 (2003).
- 4) Reiter E., Lefkowitz R. J., *Trends Endocrinol. Metab.*, **17**, 159–165 (2006).
- 5) Behar V., Pines M., Nakamoto C., Greenberg Z., Bisello A., Stueckle S. M., Bessalle R., Usdin T. B., Chorev M., Rosenblatt M., Suva L. J., *Endocrinology*, **137**, 2748–2757 (1996).
- 6) Usdin T. B., Hoare S. R., Wang T., Mezey E., Kowalak J. A., *Nat. Neurosci.*, **2**, 941–943 (1999).
- 7) Malecz N., Bambino T., Bencsik M., Nissenson R. A., *Mol. Endocrinol.*, **12**, 1846–1856 (1998).
- 8) Vilardaga J. P., Krasel C., Chauvin S., Bambino T., Lohse M. J., Nissenson R. A., *J. Biol. Chem.*, **277**, 8121–8129 (2002).
- 9) Chauvin S., Bencsik M., Bambino T., Nissenson R. A., *Mol. Endocrinol.*, **16**, 2720–2732 (2002).
- 10) Syme C. A., Friedman P. A., Bisello, A., *J. Biol. Chem.*, **280**, 11281–11288 (2005).
- 11) Gesty-Palmer D., Chen M., Reiter E., Ahn S., Nelson C. D., Wang S., Eckhardt A. E., Cowan C. L., Spurney R. F., Luttrell L. M., Lefkowitz R. J., *J. Biol. Chem.*, **281**, 10856–10864 (2006).
- 12) Hirokawa N., *Science*, **279**, 519–526 (1998).
- 13) Paschal B. M., Mikami A., Pfister K. K., Vallee R. B., *J. Cell Biol.*, **118**, 1133–1143

- (1992).
- 14) Hughes S. M., Vaughan K. T., Herskovits J. S., Vallee R. B., *J. Cell Sci.*, **108** (Pt 1), 17–24 (1995).
 - 15) King S. M., Barbarese E., Dillman III J. F., Patel-King R. S., Carson J. H., Pfister K. K., *J. Biol. Chem.*, **271**, 19358–19366 (1996).
 - 16) King S. M., Dillman III J. F., Benashski S. E., Lye R. J., Patel-King R. S., Pfister K. K., *J. Biol. Chem.*, **271**, 32281–32287 (1996).
 - 17) Harrison A., Olds-Clarke P., King S. M., *J. Cell Biol.*, **140**, 1137–1147 (1998).
 - 18) Tai A. W., Chuang J. Z., Bode C., Wolfrum U., Sung C. H., *Cell*, **97**, 877–887 (1999).
 - 19) Tai A. W., Chuang J. Z., Sung C. H., *J. Cell Biol.*, **153**, 1499–1509 (2001).
 - 20) Yano H., Lee F. S., Kong H., Chuang J., Arevalo J., Perez P., Sung C., Chao M. V., *J. Neurosci.*, **21**, RC125 (2001).
 - 21) Mueller S., Cao X., Welker R., Wimmer E., *J. Biol. Chem.*, **277**, 7897–7904 (2002).
 - 22) Ohka S., Matsuda N., Tohyama K., Oda T., Morikawa M., Kuge S., Nomoto A., *J. Virol.*, **78**, 7186–7198 (2004).
 - 23) Sugai M., Saito M., Sukegawa I., Katsushima Y., Kinouchi Y., Nakahata N., Shimosegawa T., Yanagisawa T., Sukegawa J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 24–31 (2003).
 - 24) Apodaca G., *Traffic*, **2**, 149–159 (2001).
 - 25) Cavalli V., Corti M., Gruenberg J., *FEBS Lett.*, **498**, 190–196 (2001).
 - 26) Hestermann A., Rehberg M., Graf R., *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **23**, 621–630 (2002).
 - 27) Ligon L. A., Karki S., Tokito M., Holzbaur E. L., *Nat. Cell Biol.*, **3**, 913–917 (2001).
 - 28) Takakuwa Y., *Int. J. Hematol.*, **72**, 298–309 (2000).
 - 29) Parra M., Gascard P., Walensky L. D., Gimm J. A., Blackshaw S., Chan N., Takakuwa Y., Berger T., Lee G., Chasis J. A., Snyder S. H., Mohandas N., Conboy J. G., *J. Biol. Chem.*, **275**, 3247–3255 (2000).
 - 30) Parra M., Gascard P., Walensky L. D., Snyder S. H., Mohandas N., Conboy J. G., *Genomics*, **49**, 298–306 (1998).
 - 31) Walensky L. D., Blackshaw S., Liao D., Watkins C. C., Weier H. U., Parra M., Haganir R. L., Conboy J. G., Mohandas N., Snyder S. H., *J. Neurosci.*, **19**, 6457–6467 (1999).
 - 32) Ni X., Ji C., Cao G., Cheng H., Guo L., Gu S., Ying K., Zhao R. C., Mao Y., *J. Hum. Genet.*, **48**, 101–106 (2003).
 - 33) Hoover K. B., Bryant P. J., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 229–234 (2000).
 - 34) Chishti A. H., Kim A. C., Marfatia S. M., Lutchman M., Hanspal M., Jindal H., Liu S. C., Low P. S., Rouleau G. A., Mohandas N., Chasis J. A., Conboy J. G., Gascard P., Takakuwa Y., Huang S. C., Benz Jr. E. J., Bretscher A., Fehon R. G., Gusella J. F., Ramesh V., Solomon F., Marchesi V. T., Tsukita S., Arpin M., Louvard D., Tonks N. K., Anderson J. M., Fanning A. S., Bryant P. J., Woods D. F., Hoover K. B., *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 281–282 (1998).
 - 35) McCarty J. H., Cook A. A., Hynes R. O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 13479–13483 (2005).
 - 36) Shen L., Liang F., Walensky L. D., Haganir R. L., *J. Neurosci.*, **20**, 7932–7940 (2000).
 - 37) Coleman S. K., Cai C., Mottershead D. G., Haapalahti J. P., Keinänen K., *J. Neurosci.*, **23**, 798–806 (2003).
 - 38) Binda A. V., Kabbani N., Lin R., Levenson R., *Mol. Pharmacol.*, **62**, 507–513 (2002).
 - 39) Lu D., Yan H., Othman T., Turner C. P., Woolf T., Rivkees S. A., *Biochem. J.*, **377**, 51–59 (2004).
 - 40) Zhang S., Mizutani A., Hisatsune C., Higo T., Bannai H., Nakayama T., Hattori M., Mikoshiba K., *J. Biol. Chem.*, **278**, 4048–4056 (2003).
 - 41) Fukatsu K., Bannai H., Zhang S., Nakamura H., Inoue T., Mikoshiba K., *J. Biol. Chem.*, **279**, 48976–48982 (2004).
 - 42) Sehgal S., Guerra M. T., Kruglov E. A., Wang J., Nathanson M. H., *Cell Calcium*, **38**, 469–480 (2005).
 - 43) Lu D., Yan H., Othman T., Rivkees S. A., *J. Neurosci. Res.*, **78**, 49–55 (2004).
 - 44) Saito M., Sugai M., Katsushima Y., Yanagisawa T., Sukegawa J., Nakahata N., *Biochem. J.*, **392**, 75–81 (2005).
 - 45) Matsui T., Maeda M., Doi Y., Yonemura S., Amano M., Kaibuchi K., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **140**, 647–657 (1998).
 - 46) Manno S., Takakuwa Y., Mohandas N., *J. Biol. Chem.*, **280**, 7581–7587 (2005).

- 47) Halushka P. V., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **60**, 175–189 (2000).
- 48) Honma S., Saika M., Ohkubo S., Kurose H., Nakahata N., *Eur. J. Pharmacol.*, **545**, 100–108 (2006).
- 49) Obara Y., Kurose H., Nakahata N., *Mol. Pharmacol.*, **68**, 670–679 (2005).
- 50) Kabashima K., Murata T., Tanaka H., Matsuo T., Sakata D., Yoshida N., Katagiri K., Kinashi T., Tanaka T., Miyasaka M., Nagai H., Ushikubi F., Narumiya S., *Nat. Immunol.*, **4**, 694–701 (2003).
- 51) Shenker A., Goldsmith P., Unson C. G., Spiegel A. M., *J. Biol. Chem.*, **266**, 9309–9313 (1991).
- 52) Nakahata N., Miyamoto A., Ohkubo S., Ishimoto H., Sakai K., Nakanishi H., Ohshika H., Ohizumi Y., *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **87**, 243–251 (1995).
- 53) Hirata T., Ushikubi F., Kakizuka A., Okuma M., Narumiya S., *J. Clin. Invest.*, **97**, 949–956 (1996).
- 54) Offermanns S., Laugwitz K. L., Spicher K., Schultz G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 504–508 (1994).
- 55) Djellas Y., Manganello J. M., Antonakis K., Le Breton G. C., *J. Biol. Chem.*, **274**, 14325–14330 (1999).
- 56) Vezza R., Habib A., FitzGerald G. A., *J. Biol. Chem.*, **274**, 12774–12779 (1999).
- 57) Hirata M., Hayashi Y., Ushikubi F., Yokota Y., Kageyama R., Nakanishi S., Narumiya S., *Nature*, **349**, 617–620 (1991).
- 58) Raychowdhury M. K., Yukawa M., Collins L. J., McGrail S. H., Kent K. C., Ware J. A., *J. Biol. Chem.*, **269**, 19256–19261 (1994).
- 59) Turek J. W., Halmos T., Sullivan N. L., Antonakis K., Le Breton G. C., *J. Biol. Chem.*, **277**, 16791–16797 (2002).
- 60) Yukawa M., Yokota R., Eberhardt R. T., von Andrian L., Ware J. A., *Circ. Res.*, **80**, 551–556 (1997).
- 61) Becker K. P., Garnovskaya M., Gettys T., Halushka P. V., *Biochim. Biophys. Acta*, **1450**, 288–296 (1999).
- 62) Miggin S. M., Kinsella B. T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1425**, 543–559 (1998).
- 63) Minneman K. P., *Mol. Interv.*, **1**, 108–116 (2001).
- 64) Spengler D., Waeber C., Pantaloni C., Holsboer F., Bockaert J., Seeburg P. H., Journot L., *Nature*, **365**, 170–175 (1993).
- 65) Namba T., Sugimoto Y., Negishi M., Irie A., Ushikubi F., Kakizuka A., Ito S., Ichikawa A., Narumiya S., *Nature*, **365**, 166–170 (1993).
- 66) Miyosawa K., Sasaki M., Ohkubo S., Nakahata N., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 719–724 (2006).
- 67) Tanaka K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 537–541 (1998).
- 68) Groettrup M., Schmidtke G., *Drug Discov. Today*, **4**, 63–71 (1999).
- 69) Preckel T., Fung-Leung W. P., Cai Z., Vitiello A., Salter-Cid L., Winqvist O., Wolfe T. G., Von Herrath M., Angulo A., Ghazal P., Lee J. D., Fourie A. M., Wu Y., Pang J., Ngo K., Peterson P. A., Fruh K., Yang Y., *Science*, **286**, 2162–2165 (1999).
- 70) Wojcik C., Tanaka K., Paweletz N., Naab U., Wilk S., *Eur. J. Cell Biol.*, **77**, 151–160 (1998).
- 71) Wojcik C., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**, 273–276 (1999).
- 72) Tanahashi N., Yokota K., Ahn J. Y., Chung C. H., Fujiwara T., Takahashi E., DeMartino G. N., Slaughter C. A., Toyonaga T., Yamamura K., Shimbara N., Tanaka K., *Genes Cells*, **2**, 195–211 (1997).
- 73) Murata S., Kawahara H., Tohma S., Yamamoto K., Kasahara M., Nabeshima Y., Tanaka K., Chiba T., *J. Biol. Chem.*, **274**, 38211–38215 (1999).
- 74) Jiang H., Monaco J. J., *Immunogenetics*, **46**, 93–98 (1997).
- 75) Sasaki M., Miyosawa K., Sukegawa J., Yanagisawa T., Ohkubo S., Nakahata N., *J. Pharmacol. Sci.*, **94**, 98P (2004).
- 76) Terrillon S., Bouvier M., *EMBO Rep.*, **5**, 30–34 (2004).
- 77) Sasaki M., Miyosawa K., Ohkubo S., Nakahata N., *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 263–270 (2006).
- 78) Meusser B., Hirsch C., Jarosch E., Sommer T., *Nat. Cell Biol.*, **7**, 766–772 (2005).
- 79) Kelley L. P., Kinsella B. T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1621**, 192–203 (2003).
- 80) Habib A., FitzGerald G. A., Maclouf J., *J. Biol. Chem.*, **274**, 2645–2651 (1999).