Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

ADP-ribosylation of the bovine brain rho protein by botulinum toxin type C1

菊池, 章

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1989-02-28
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲0800
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000800

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・(本籍)　菊池　章　(兵庫県)

学位の種類　医学博士

学位記番号　医博い第623号

学位授与の要件　学位規則第5条第1項該当

学位授与の日付　平成元年2月28日

学位論文題目　ADP－ribosylation of the Bovine Brain *rho* Protein by Botulinum Toxin Type C1.
(ボツリヌス毒素C1型によるウシ大脳 *rho* 蛋白質のADPリボシル化)

審査委員　主査　教授　藤田拓男
教授　高井義美　教授　藤原美定

論文内容の要旨

[序文]

ボツリヌス毒素はコリン作動性のシナプスからの神経伝達物質の放出を阻害することが知られているが、その作用機構は不明である。最近、本毒素が細胞膜画分に存在する分子量2万余りのいくつかの蛋白質をADPリボシル化することが報告されている。さらに、これらの蛋白質はそのADPリボシル化反応がGDP、GTP、GTPγSによって促進されることから、GTP結合蛋白質(G蛋白質)であることが示唆されている。一方、哺乳類細胞には分子量2万余りの一群のG蛋白質が存在することが明らかにされている。これまでに哺乳類細胞では ras (Ha-、Ki-、N-ras)、rho、ral、R-ras、rab2、ypt 1遺伝子がこの分子量2万余りのG蛋白質をコードすることが明らかにされており、これらのG蛋白質も今までによく知られているG_s、G_i、ペプチド伸長因子などのG蛋白質と共通してGTP希有号活性とGTPase活性に対応するアミノ酸配列を有している。さらに、ADPリボシル化因子(ARF)およびG_pと呼ばれる分子量2万余りのG蛋白質がウシ大脳の粗膜画分から精製されている。ここでは、これら分子量2万余りの一群のG蛋白質を低分子量G蛋白質と呼ぶ。最近、私共はウシ大脳の粗膜画分から少なくとも15種類の低分子量G蛋白質を分離し、そのうち4種類の低分子量G蛋白質をほぼ均一にまで精製してその性状を解析している。その結果、2種類のG蛋白質は既知のc-Ki-ras蛋白質(c-Ki-ras p21)とrho蛋白質(rho p20)であったが、他の2種類は新しいG蛋白質であり、そのcDNAをクローニングして一次構造を決定し、それらをsmg p25Aとsmg p21と命名している。そこで、本研究ではウシ大脳の低分子量G蛋白質とボツリヌス毒素との関連について解析した。

[方法]

(1) G蛋白質の精製－G蛋白質はウシ大脳の粗膜画分からコール酸で可溶化し、その抽出液をウルトロゲルAcA－44、フェニルセファロースCL－4B、ハイドロキシアパタイト、モノQのカラムクロマトグラフィーを組み合わせて精製した。

(2) GTPγS結合活性の測定－［^{35}S］GTPγSとG蛋白質を30℃で90分間インキュベートし、G蛋白質に結合する［^{35}S］GTPγS量を測定した。

(3) GPTase活性の測定－［γ－^{32}P］GTPとG蛋白質を30℃で60分間インキュベートし、放出される$^{32}P_i$量を測定した。

(4) ADPリボシル化活性の測定－ボツリヌス毒素C1型と［γ－^{32}P］NADの存在下にサンプルを30℃で90分間インキュベートし、反応停止後、SDS－ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。続いて、ゲルを乾燥し、オートラジオグラフィーを行い、放射活性のあるバンドをゲルより切り出し、その放射活性を測定した。

[結果]

(1) 15種類の低分子量G蛋白質のうち3種類がボツリヌス毒素によりADPリボシル化され、そのうちの1つはrho p20であった。精製したsmg p21、smg p25A、c-Ki-ras p21はボツリヌス毒素によりADPリボシル化されなかった。

(2) 精製したrho p20はボツリヌス毒素により時間依存性、用量依存性にADPリボシル化され、1モルのrho p20に最大0.4モルのADPリボースが取り込まれた。

(3) GDP結合型rho p20とGTPγS結合型rho p20は同じ速度でボツリヌス毒素によりADPリボシル化された。

(4) ボツリヌス毒素によるADPリボシル化はrho p20のGTPγS結合活性やGTPase活性に影響しなかった。

(5) rho p20のADPリボシル化はMg^{2+}依存性であり、0.2－0.5mM Mg^{2+}存在下で最大限にADPリボシル化された。低濃度のMg^{2+}(50nM)存在下ではGDP、GDP、GDPγSはその濃度依存性にrho p20のADPリボシル化を促進したが、高濃度のMg^{2+}(0.5mM)存在下ではこれらのグアニンヌクレオチドはADPリボシル化を促進しなかった。

[考察]

ボツリヌス毒素C1、C3、D型によりADPリボシル化される蛋白質は低分子量G蛋白質である可能性が示唆されていたが、その実体は不明であった。今回の実験結果より、ボツリヌス毒素C1型は3種類の低分子量G蛋白質をADPリボシル化し、そのうちの1つはrho p20であることが明らかとなった。

rho遺伝子は最初にアメフラシより単離され、続いて酵母、ショウジョウバエ、ラット、ヒトで検出されている。rho遺伝子から推定されるアミノ酸配列は他のG蛋白質と同様のGTP結合活性

とGTPase活性に共通な構造を有している。事実、私共の精製しているrho p20はGTPγS結合活性とGTPase活性を有している。他のG蛋白質とのアナロジーでrho p20にもGDP結合型の不活性型とGTP結合型の活性型が存在するものと考えられる。どのような蛋白質が不活性型を活性型に変えたり、またどのような蛋白質が活性型の標的になるかは明らかになっていない。ボツリヌス毒素によるrho p20のADPリボシル化は、そのGTPγS結合活性とGTPase活性に影響しないことから、rho p20はADPリボシル化されると上記の変換蛋白質や標的蛋白質との共役が阻害される可能性がある。

ヒトrho蛋白質とヒトHa－ras P21のアミノ酸配列上の相同性は約35%である。ras p21は細胞の増殖分化などの細胞機能に関与していることが示されている。rho p20もras p21とのアナロジーでさまざまな細胞機能を制御していると考えられるが、その生理的役割は現在明らかではない。ボツリヌス毒素が神経伝達物質の放出を阻害することはよく知られている。ボツリヌス毒素によるADPリボシル化が分泌反応の制御に関与している証拠は現在得られていないが、rho p20が分泌反応に関与している可能性は充分あろう。G_sやG_iの機能を解明するのにコレラ毒素と百日咳毒素が有効な手段となったようにボツリヌス毒素がrho p20の機能を明らかにする手段となる可能性がある。また、逆にrho p20の機能を明らかにすることがこれまで不明であったがボツリヌス毒素の作用機構の解明に役立つと考えられる。

なお、ADPリボシル化反応が低濃度（50nM）のMg^{2+}存在下でグアニンヌクレオチドにより促進されるが、このために必要なグアニンヌクレオチドの濃度はrho p20がグアニンヌクレオチドと最大結合活性を示すのに必要な濃度の約10倍である。このグアニンヌクレオチドによるADPリボシル化促進の作用機構は不明である。

論文審査の結果の要旨

ボツリヌス毒素はコリン作動性のシナプスからの神経伝達物質の放出を阻害するが、その作用機序は不明であった。最近本毒素は細胞膜に存在する分子量約2万のGDP結合蛋白をADPリボシル化することが明きらかになった。同様のG蛋白は哺乳類細胞に広く存在し、ras,rho,ral,R－ras, rab2,ypt1遺伝子によってコードされ、低分子量G蛋白と総称されている。最近第一生化学教室で少なくとも15種の低分子量G蛋白を分離し、その中4種を精製した。本研究者はこれらのウシ大脳の低分子量G蛋白とボツリヌス毒素との関連について検討した。

その結果15種類の低分子量G蛋白質の中、3種類がボツリヌス毒素によりADPリボシル化され、その中の一つはrho p20であった。精製したrho p20はボツリヌス毒素により時間依存性用量依存性にADPリボシル化され1モルのrho p20に最大0.4モルのADPリボースが取りこまれた。又GDP結合型rho p20とGTPγS結合型rho p20は同じ速度でADPリボシル化された。又ボツリヌス毒素によるADPリボシル化はrho p20のGTPγS結合活性やGTPase活性には影響しなかった。又rho p20のADPリボシル化はMg^{2+}依存性であり0.2－0.5mMのMg^{2+}存在下で最大の

反応がおこり高濃度のMg^{2+}存在下ではADPリボシル化の促進作用はなかった。

ボツリヌス毒素によるrho p20のADPリボシル化はそのGTPγS結合活性とGTPase活性に影響しないことから、rho p20がADPリボリス化されると変換蛋白質や標的蛋白質との共役が阻害される可能性がある。ヒトrho蛋白とHa－ras p21蛋白の間には約35%のアミノ酸相同性があり、ras p21は細胞の増殖分化などに関与しているのでp20も何等かの細胞機能を調節している可能性があるがその生理作用は明きらかではない。しかしながらボツリヌス毒素が神経伝達物質の放出を阻害することによって神経の伝達機能を抑制して中毒作用を発現している可能性がある。

以上、本研究者は従来殆ど行われていなかったボツリヌス毒素の低分子G蛋白に対する効果を研究することにより、神経伝達機能の基礎的機序を明きらかにするとともに細胞の情報伝達機構の解明に役立つ重要な知見を得たものであり価値ある集積と考えられる。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると考えられる。