



Phosphorylation of smg p21, a ras p21-like GTP-binding protein, by cyclic AMP-dependent protein kinase in a cell-free system and in response to prostaglandin E1 in intact human...

河田, 正仁

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1990-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0873

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000873>

※ 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)	かわ　　た　　まさ　　ひと 河　　田　　正　　仁　　(兵庫県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第662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2年3月31日
学位論文題目	Phosphorylation of <i>smg</i> p21, a <i>ras</i> p21-like GTP-binding Protein, by Cyclic AMP-dependent Protein Kinase in a Cell-free System and in Response to Prostaglandin E ₁ in Intact Human Platelets (<i>ras</i> p21類似GTP結合蛋白質 <i>smg</i> p21の無細胞系およびヒト血小板におけるプロスタグランディンE ₁ 刺激後のサイクリックAMP依存性プロテインキナーゼによるリン酸化)
審査委員	主査 教授 高井 義美 教授 福崎 恒 教授 藤原 義定

論文内容の要旨

〔緒言〕

哺乳動物の細胞膜には、 $\alpha\beta\gamma$ サブユニット構造を持つ分子量約8万のGTP結合蛋白質（高分子量G蛋白質）の一群が存在し、細胞膜レセプターのトランスデューサーとして働いていることが知られている。一方、*ras* がん遺伝子産物（*ras* p21）は分子量約2.1万のGTP結合蛋白質で、細胞の増殖やがん化、分化など種々の細胞機能の制御に関与することが報告されている。最近、哺乳動物の組織には多数の*ras* p21に類似した分子量2万余りのG蛋白質（低分子量G蛋白質）が存在していることが明らかにされている。これらの低分数量G蛋白質の生理的な機能は現在のところなお不明であるが、これらもまた種々の細胞機能の制御に関与していると考えられている。本研究室では、すでに多くの低分子量G蛋白質を哺乳動物の各組織から精製しているが、本研究室で発見された低分数量G蛋白質の *smg* p21は、その構造から *ras* p21と同じエフェクター部位を持っていることが判明している。この構造の特徴から、*smg* p21は *ras* p21と協同的あるいは拮抗的に作用する可能性が考えられる。実際、*smg* p21の遺伝子は後に野田らによって *ras* p21のトランスフォーメーション活性を抑制する遺伝子としてクローニングされた *Krev-1* と同じであることも判明している。*smg* p21は生体内に広く存在しているが、中でも血小板では最も多量に存在するG蛋白質である。

一方、細胞内の主要な情報伝達系として、サイクリックAMP（cAMP）-Aキナーゼ系やジグリセリド（DG）-Cキナーゼ系、 Ca^{2+} -カルモデュリン系がよく知られている。低分子量G蛋白質の少なくとも一部はこれらの細胞内情報伝達系と関連している可能性が強く、その関連を明らかにすることは細胞内情報伝達系のネットワークを明らかにする上できわめて重要である。

そこで、本研究では低分子量G蛋白質とこれらの細胞内情報伝達系との関連を明らかにすることを

目的とし、種々の低分子量G蛋白質がAキナーゼやCキナーゼでリン酸化されるか否かを無細胞系および血小板をモデルとした細胞系で解析した。その結果、多くの低分子量G蛋白質の中で、*smg p21*のみがAキナーゼによって無細胞系でも血小板でもリン酸化されることが判明し、*smg p21*が細胞内情報伝達系のネットワークの中で重要な役割を果していることが明らかになった。

[方 法]

無細胞系でのリン酸化反応はウシ大脳から精製した *smg p21*, *ras p21*などの低分子量G蛋白質を [γ - 32 P] ATPの存在下で精製したAキナーゼまたはCキナーゼと30℃で反応させて行った。反応後の試料をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、オートラジオグラフィーを行い、放射活性を持つバンドをゲルから切り出してリン酸化の程度を液体シンチレーションカウンターで測定した。*smg p21*に対するGTP 結合能は *smg p21*に放射性的な非水解性のGTPのアナログである [35 S] GTP γ Sを結合させ、ニトロセルロース膜に捕足して測定した。*smg p21*のGTPase活性は *smg p21*が [γ - 32 P] GTPを水解することによって放出される 32 P_iの放射活性を測定することで推定した。ヒト血小板でのリン酸化反応は洗浄血小板を 32 P_iで37℃、1時間標識した後に、プロスタグランジンE₁ (PGE₁) で3分間、ジブチリルcAMP (Bt₂cAMP) で10分間、それぞれ37℃で刺激して行った。反応後の試料をSDS-PAGEまたは二次元電気泳動で分離し、オートラジオグラフィーを行ってリン酸化された蛋白質を同定した。二次元のペプチドマップはリン酸化した試料をSDS-PAGEで分離した後、放射活性を持つバンドをゲルから切り出して抽出し、TPCKトリプシンでペプチドに完全に消化した。消化したペプチドを薄層ゲルにプロットし、電気泳動の後に薄層クロマトグラフィーを行い、オートラジオグラフィーでリン酸化されたペプチドを同定した。

[結 果]

(1) 無細胞系におけるウシ大脳 *smg p21*のAキナーゼによるリン酸化反応

精製した *smg p21*はAキナーゼの触媒ユニットでリン酸化され、SDS-PAGE上わずかに上方に移動した。このリン酸化反応はAキナーゼに特異的なプロテインインヒビターによって抑制された。*smg p21*はAキナーゼのホロ酵素によって cAMP依存性にリン酸化された。*smg p21*のAキナーゼによるリン酸化は時間依存性に起こり、1モルの *smg p21*に対して最大約1モルのリン酸が取り込まれた。この時、セリン残基のみがリン酸化された。*smg p21*のK_m値は0.11+0.02 μ Mで、Aキナーゼの良い基質として知られているH2Bヒストンの1/1000以下であり、*smg p21*はH2BヒストンよりAキナーゼに対する親和性が強かった。*smg p21*にはGTPを結合した活性型とGDPを結合した不活性型が存在するが、*smg p21*をあらかじめGTP γ S結合型にしてもGDP結合型にしてもリン酸化の初速度には影響しなかった。また、リン酸化は *smg p21*のGTP γ S結合能やGTPase活性に影響しなかった。ウシ大脳の *smg p21*のみならず、ヒト血小板の *smg p21*もAキナーゼによって同様にリン酸化され、リン酸化されたペプチドは二次元のペプチドマップの結果、完全に一致した。

なお, smg p21はCキナーゼによってリン酸化されなかった。また, c-Ki-ras p21はAキナーゼによって蛋白質1モルに対して約0.1モルしかリン酸が取り込まれず, Cキナーゼによってはリン酸化されなかった。ウシ大脳や血小板から分離, 精製したその他の低分子量G蛋白質はAキナーゼでもCキナーゼでもリン酸化されなかった。

(2) ヒト血小板における smg p21のPGE とBt cAMP刺激によるリン酸化反応

従来より報告されているように, ヒト血小板をPGE やBt cAMPによって刺激すると, SDS-PAGE上分数量約24万, 5万, 2.4万, 2.2万の蛋白質がリン酸化されたが, 無細胞系でAキナーゼによってリン酸化された smg p21はSDS-PAGE上, 分子量2.2万の蛋白質に一致した。また, 無細胞系でAキナーゼによってリン酸化された smg p21は, ヒト血小板においてPGE やBt cAMP刺激によってリン酸化された分子量2.2万の蛋白質と二次元電気泳動上完全に一致した。さらに, 無細胞系でリン酸化された smg p21と血小板中でリン酸化された smg p21の放射性ペプチドは二次元のペプチドマップで一致し, 両反応のリン酸化部位は同一と考えられた。以上の結果から, ヒト血小板において, PGE とBt cAMP刺激によってリン酸化される分子量2.2万の蛋白質は smg p21であり, smg p21は無細胞系でも血小板中でもAキナーゼによってリン酸化されることが明らかになった。

[考 察]

本研究では, ウシ大脳やヒト血小板の膜画分から精製した多くの低分子量G蛋白質の中で smg p21のみが無細胞系でAキナーゼによってリン酸化されることが明らかになった。また, 血小板の smg p21はPGE とBt cAMPによる刺激に反応して, Aキナーゼによって直接リン酸化されることも明らかとなり, smg p21は血小板中でもAキナーゼによってリン酸化されることが証明された。smg p21をGTP結合型にしてもGDP結合型にしてもAキナーゼによるリン酸化の初速度には影響せず, Aキナーゼによる smg p21のリン酸化反応は smg p21のGTP結合能やGTPase活性に影響を及ぼさないことから, 本リン酸化反応は smg p21とその標的物質などの他の物質の相互作用に影響を及ぼす可能性が強い。

血小板の凝集, 分泌反応はDG-Cキナーゼ系とCa²⁺-カルモデュリン系が促進的に作用するのに対して, cAMP-Aキナーゼ系は抑制的に作用することが知られている。このようなDC-Cキナーゼ系, Ca²⁺-カルモデュリン系とcAMP-Aキナーゼ系が拮抗する系は bidirectional 系と呼ばれ, 血小板以外にも血管平滑筋など多くの細胞で認められる。Aキナーゼによる抑制機構の一つとして, 小胞体から細胞質へのCa²⁺動員を阻害することが知られているが, 血小板ではこの機構に分子量2.2万の蛋白質のリン酸化反応が関与する可能性が示唆されている。本研究で, この分子量2.2万の蛋白質が smg p21そのものであることが判明したことから, Aキナーゼが smg p21のリン酸化反応を介して小胞体から細胞質へのCa²⁺動員を阻害し, DG-Cキナーゼ系とCa²⁺-カルモデュリン系を抑制する可能性が考えられる。さらに, smg p21は細胞質へのCa²⁺動員以外の機能に関与する可能性もあり, 本G蛋白質はDG-Cキナーゼ系, Ca²⁺-カルモデュリン系とcAMP-Aキ

ナーゼ系という主要な細胞内情報伝達系の接点に位置し、細胞機能の“on” “off”の制御に重要な役割を果たしている可能性が強い。

論文審査の結果の要旨

哺乳動物の細胞膜には、 $\alpha\beta\gamma$ のサブユニット構造を持つ分子量約8万のGTP結合蛋白質の一群（高分子量G蛋白質）が存在し、細胞膜レセプターのトランスデューサーとして働いていることが知られている。一方、*ras* がん遺伝子産物（*ras* p21）は分子量約2.1万のG蛋白質で、細胞の増殖やがん化、分化など種々の細胞機能の制御に関与することが報告されている。最近、哺乳動物の組織には多数の *ras* p21に類似した分子最2万余りのG蛋白質（低分子量G蛋白質）が存在していることが明らかにされている。これらのうち、本研究室で発見された低分子量G蛋白質の *smg* p21は *ras* p21と同じエフェクター部位を持っており、*ras* p21と協同的あるいは拮抗的に作用する可能性が考えられる。このことから、*smg* p21も *ras* p21と同様に細胞機能の制御に重要な役割を果たしている可能性が強い。

一方、細胞内の主要な情報伝達系として、サイクリックAMP（cAMP）-Aキナーゼ系やジグリセリド（DG）-Cキナーゼ系、 Ca^{2+} -カルモデュリン系がよく知られている。低分子量G蛋白質がこれらの細胞内情報伝達系と関連している直接的な証拠は *ras* p21を除いてこれまでほとんど明らかではなかった。本研究は *smg* p21について、その無細胞系およびヒト血小板におけるAキナーゼによるリン酸化を解析したものである。その結果、多くの低分子量G蛋白質の中で、*smg* p21のみが無細胞系においてもヒト血小板においてもAキナーゼによってリン酸化されることが判明した。従来より、血小板の凝集、分泌反応はDG-Cキナーゼ系と Ca^{2+} -カルモデュリン系が促進的に作用するのに対して、cAMP-Aキナーゼ系は抑制的に作用することが知られている。このようなDG-Cキナーゼ系、 Ca^{2+} -カルモデュリン系とcAMP-Aキナーゼ系が拮抗する系は *bidirectional* 系と呼ばれ、血小板以外にも血管平滑筋など多くの細胞で認められる。Aキナーゼによる抑制機構の一つとして、小胞体から細胞質への Ca^{2+} 動員を阻害することが知られているが、血小板ではこの機構に分子量2.2万の蛋白質のリン酸化が関与する可能性が示唆されている。本研究では、この分子量2.2万の蛋白質が *smg* p21そのものであることも判明した。このことから、Aキナーゼが *smg* p21のリン酸化反応を介して小胞体から細胞質への Ca^{2+} 動員を阻害し、DG-Cキナーゼ系と Ca^{2+} -カルモデュリン系を抑制する可能性が考えられる。本研究では、従来ほとんど行なわれていなかった低分子量G蛋白質と細胞内情報系との関連の直接的な証拠を得ることができ、*smg* p21がDG-Cキナーゼ系、 Ca^{2+} -カルモデュリン系とcAMP-Aキナーゼ系という主要な細胞内情報伝達系の接点に位置し、細胞機能の“on”と“off”の制御に重要な役割を果たしている可能性を示した点で価値ある集積であると認める。よって、本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。