



Small molecular weight GTP-binding proteins in human erythrocyte ghosts

池田, 和人

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1990-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0904

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000904>

※ 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) いけ だ かず と 人 (大阪府)

学位の種類 医学博士

学位記番号 医博い第676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 Small Molecular Weight GTP-binding Proteins
in Human Erythrocyte Ghosts

(ヒト赤血球膜における低分子量GTP結合蛋白質)

審査委員 主査教授 高井義美

教授 藤原美定 教授 藤田拓男

論文内容の要旨

[序文]

ある種のGTP結合蛋白質(G蛋白質)が細胞膜情報伝達機構においてトランスデューサーとして重要な働きをしていることは良く知られている。これらのG蛋白質にはGs, Gi, Go, トランスデューションが存在し、いずれも α , β , γ サブユニットからなる三量体である。このうち分子量4万前後の α サブユニットがGTP結合活性とGTPase活性を有している。最近、これらトランスデューサー型のG蛋白質とは別に哺乳類細胞には分子量2万前後のG蛋白質(低分子量G蛋白質)が存在することが明らかになっている。これまでに哺乳類細胞ではras(Ha-, Ki-, N-ras), rho, ral, R-ras, rab 2, ypt 1遺伝子が分子量2万あまりのG蛋白質をコードし、これら低分子量G蛋白質は従来から知られているG蛋白質と同様にGTP結合活性とGTPase活性に対応するアミノ酸配列を有していることが明らかになっている。本研究室ではウシ大脳の粗膜画分から、分子量24,000(smg p25A), 22,000(smg p21), rho遺伝子蛋白質, c-Ki-ras p21の4種類の低分子量G蛋白質を精製し、その性状を解析している。低分子量G蛋白質の生理的役割は不明であるが、最近、ras p21やrho遺伝子蛋白質が細胞骨格を制御している可能性が報告されている。一方、ヒト赤血球膜は主要な構成蛋白質がすでに同定されており、細胞骨格における研究が最も詳細に行われている。そこで、本研究では低分子量G蛋白質の細胞骨格の制御における役割を明らかにする第一歩として、ヒト赤血球における低分子量G蛋白質の精製と解析を行った。

[方法]

(1) G蛋白質の精製——健常人より採取した全血200mlを2,300×g, 10分間遠心し、血清を吸引

除去した。沈殿した赤血球を低張破碎し、 $20,000 \times g$ 、15分間遠心後、その沈殿を洗浄して赤血球膜として使用した。赤血球膜を1%コール酸ナトリウムで1時間可溶化し、その抽出液からウルトロゲルAcA-44、ハイドロキシアパタイト、モノQによるカラムクロマトグラフィーを行い、G蛋白質を精製した。

(2) G蛋白質の測定——(i) $[^{35}S]$ GTP γ SとG蛋白質を30°Cで90分間インキュベートし、G蛋白質に結合する $[^{35}S]$ -GTP γ S量を測定した。(ii) G蛋白質をSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、ニトロセルロース膜に転写した。続いて、このニトロセルロース膜を $[\alpha-^{32}P]$ GTPと共に30°Cで90分間インキュベートし、ニトロセルロース膜を乾燥した後、オートラジオグラフィーを行った。

(3) G蛋白質のイムノプロット法による解析——G蛋白質をSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、ニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜を、次に抗ras p21、抗ADPリボシル化因子(ARF)、抗Gs、抗Gi、および抗Go抗体と共に室温で60分間インキュベートした。ニトロセルロース膜上の抗ras p21、抗Giおよび抗Go抗体はビオチン化IgG抗体と室温で40分間インキュベートし、さらにアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体とインキュベートした後、ナフトールにより発色させて検出した。一方、抗ARFと抗Gs抗体はニトロセルロース膜を ^{125}I 標識抗ウサギイムノグロブリンと共に室温で40分間インキュベートした後、オートラジオグラフィーを行って検出した。

[結果]

(1) 低分子量G蛋白質の精製——ヒト赤血球膜のコール酸抽出液をウルトロゲルAcA-44でカラムクロマトグラフィーを行うと、 $[^{35}S]$ GTP γ S結合活性は単一のピークとして溶出された。このピークをハイドロキシアパタイトでカラムクロマトグラフィーを行うと、 $[^{35}S]$ GTP γ S結合活性は10mM KH₂PO₄と100mM KH₂PO₄で溶出される2つのピークを示した。100mM KH₂PO₄で溶出されたピークには抗ras p21、抗Gs、抗Gi抗体と反応するG蛋白質が存在した。10mM KH₂PO₄で溶出されたピークをモノQでカラムクロマトグラフィーを行うと、 $[^{35}S]$ GTP γ S結合活性は大小2つのピークとして溶出された。この大きなピークには電気泳動上、銀染色で分子量20,000前後の蛋白バンドが3本認められた。このピークをニトロセルロース膜に転写し、 $[\alpha-^{32}P]$ GTPと反応させ、オートラジオグラフィーを行うと、分子量約22,000の部分に放射活性が認められた。そこで、この赤血球膜における低分子量G蛋白質を22KGと命名した。小さなピークについては今回検討を行わなかった。また、抗体を用いた解析の結果、ヒト赤血球膜にはARFおよびGoは存在しなかった。

(2) 22KGの性状——部分の精製した22KGは時間依存性、容量依存性に $[^{35}S]$ GTP γ Sと結合し、GTP γ Sに対する結合のKd値は約50nMであった。22KGと $[^{35}S]$ GTP γ Sの結合は非放射性のGTP γ S、GTP、GDPで抑制されたが、ATP、UTP、CTPでは抑制されなかった。22KGの $[^{35}S]$ GTP γ Sへの結合はN-エチルマレイミドにより抑制された。このN-エチ

ルマレイミドによる抑制はジチオスレイトールにより解除された。

[考 察]

ヒト赤血球膜における低分子量G蛋白質の存在はこれまで不明であったが、今回の実験結果から、まず、ras p21がヒト赤血球膜に存在することが明らかになった。本研究室では、すでにヒト赤血球膜の構成蛋白質であるバンド4・2とバンド6が大腸菌で人工的に発現させたKi-ras p21と結合することを報告している。また、バンド4・2とバンド6がバンド3と結合し、さらにバンド3はアンキリンおよびバンド4・1と結合することも明らかにされており、これらの赤血球の細胞骨格蛋白質は相互作用をすることによって細胞形態を保持していると考えられている。

これらの結果から、ras p21はヒト赤血球膜の細胞骨格の制御に関与していると考えられる。一方、今回ヒト赤血球膜より部分精製された22KGはイムノブロッティングにおいて抗ras p21、抗ARF、抗Gs、抗Giおよび抗Go抗体と反応しなかった。また、22KGは蛋白質染色上、分子量22,000を示したのに対し、smg p25Aとrho遺伝子蛋白質の分子量はそれぞれ24,000と20,000であった。さらに、モノQによるカラムクロマトグラフィー上、22KGは120mMのNaClで溶出されたのに対し、smg p25Aとrho遺伝子蛋白質はそれぞれ250mMと200mMのNaClで溶出された。最近、ヒト血小板と胎盤からGpと呼ばれる低分子量G蛋白質が β 、 γ サブユニットと共に精製されたと報告されている。しかし、22KGは β 、 γ サブユニットと共に精製されなかった。したがって、これらの実験結果から、22KGは既知の低分子量G蛋白質とは異なる新しいG蛋白質である可能性が強い。

22KGのヒト赤血球における生理的役割は現在不明であるが、最近、本研究室ではrho遺伝子蛋白質がボツリヌス毒素のADPリボシル転移酵素によりADPリボシル化されることを証明している。一方、真核細胞のVero細胞にこのリボリヌス酵素を作用させると、Vero細胞のマイクロフィラメントが消失し、放射状の形態変化を起こすことから、rho遺伝子蛋白質が細胞骨格維持に関与している可能性が推定されている。また、ras p21をNIH 3T3細胞やPC12細胞にマイクロインジェクションすると一時的な形態変化を起こすことも報告されている。したがって、22KGもまたras p21やrho遺伝子蛋白質と同様に細胞骨格の制御に関与している可能性が考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

哺乳動物の細胞膜には、細胞の膜情報伝達機構のトランスデューサーとして働くGTP結合蛋白質(G蛋白質)が存在する。これらのG蛋白質は α 、 β 、 γ サブユニットからなり、このうち分子量4万前後の α サブユニットがGTP結合活性とGTPase活性を有している。最近、これらトランスデューサー型のG蛋白質とは別に哺乳動物の組織に分子量2万前後のG蛋白質(低分子量G蛋白質)が多数存在することが明らかになっている。本研究室でもウシ大脳の粗膜画分から、分子量24,000(smg p25A)、22,000(smg p21)、rho遺伝子蛋白質、c-Ki-ras p21の4種類の低分子量G蛋白質を精製し、その性状を解析している。低分子量G蛋白質の生理的役割は不明であるが、ras p21やrho遺

伝子蛋白質は細胞骨格を制御している可能性が報告されている。一方、ヒト赤血球膜は主要な構成蛋白質がすでに同定されており、細胞骨格における研究が最も詳細に行われている。しかし、低分子量G蛋白質の存在は不明であった。本研究はヒト赤血球膜における低分子量G蛋白質の精製と解析を行ったものである。

その結果、本研究でまず、ras p21がヒト赤血球膜に存在することを明らかにしている。本研究室では、すでにヒト赤血球膜の構成蛋白質であるバンド4・2とバンド6が大腸菌で人工的に発現させたras p21と結合することを明らかにしている。このバンド4・2とバンド6はバンド3を介してアンキリンおよびバンド4・1と結合することが明らかになっている。これらの赤血球の細胞骨格蛋白質は相互作用をすることで細胞形態を保持していると考えられており、ras p21もヒト赤血球の細胞骨格に関与している可能性が示唆される。さらに、本研究では、分子量22,000の低分子量G蛋白質(22KG)を部分精製している。22KGは蛋白質染色、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどの結果より、既知の低分子量G蛋白質であるsmg p25A、rho遺伝子蛋白質、Gpとは異なった新しいG蛋白質であると考えられる。22KGのヒト赤血球における生理的役割は現在不明であるが、ras p21やrho遺伝子蛋白質と同様に細胞骨格に制御に関与している可能性が考えられる。

このように本研究では、従来不明であったヒト赤血球膜の低分子量G蛋白質の存在を明らかにし、低分子量G蛋白質が細胞骨格の制御に関与している可能性を示唆した点で価値ある集積であると考えられる。よって、本研究は医学博士の学位を得る資格があると認める。