



Intrasynaptosomal distribution of the ras, rho and smg-25A GTP-binding proteins in bovine brain

金, 成有

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1990-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0910

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000910>

※ 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・（国籍）	金 成 有 （大韓民国）
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博い第682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	Intrasynaptosomal distribution of the <i>ras</i> , <i>rho</i> and <i>smg-25A</i> GTP-binding proteins in bovine brain ウシ大脳における <i>ras</i> , <i>rho</i> および <i>smg-25A</i> GTP 結合 蛋白質のシナプス内分布
審 査 委 員	主査 教授 高 井 義 美 教授 岡 田 安 弘 教授 松 本 悟

論 文 内 容 の 要 旨

序 文

生体内には、 $\alpha\beta\gamma$ のサブユニット構造を持ったGsや、Gi、Go、トランスデュースンといったGTP結合蛋白質（高分子量G蛋白質）が存在し、この一群のG蛋白質は細胞膜受容体のトランスデュースーとして働いていることが知られている。この一群のG蛋白質に加え、生体内には、サブユニット構造を持たない別の一群のG蛋白質（低分子量G蛋白質）が存在する。この一群の低分子量G蛋白質をコードする遺伝子には、*ras* (Ki-, Ha-, N-), *rho* (-A, -B, -C), *rab* (-1, -2, -3, -4), *R-ras*, *ypt1*, *arf* 等20種類以上が見い出されており、最近その産物の細胞機能の制御における重要性が注目されている。特に、低分子量G蛋白質の多くが大脳に多量に分布していることから、その神経機能の制御との関係に関心が払われている。しかし、低分子量G蛋白質の神経組織における機能については現在全く不明である。本研究では低分子量G蛋白質のうち、ウシ大脳膜画分よりほぼ均一にまで精製されているc-Ki-ras蛋白質 (c-Ki-ras p21), *rhoB* 蛋白質 (*rhoB* p20), *smg-25A* 蛋白質 (*smg* p25A) に関し、これら3つの低分子量G蛋白質の機能を解明する第一歩として、そのシナプス内での分布をウシ大脳を用いて検索した。その結果、その分布の相違から、これらのG蛋白質が異なった神経機能に関与している可能性があることが明らかとなった。

実験方法

ウシ大脳の細胞分画法は、Ueda らの方法に従って行った。高分子量G蛋白質のそれぞれの α サブユニットはGTP結合活性とGTPase活性を有しているが、低分子量G蛋白質も前述したように、

高分子量 G 蛋白質の GTP 結合活性と GTPase 活性に対応するアミノ酸配列を有することが明らかにされている。この GTP 結合活性を利用して、 ^{35}S で標識された GTP γS を用いてニトロセルロース法により、G 蛋白質の総量を測定した。G 蛋白質の ADP リボシル化は、 ^{32}P で標識された NAD を用いて、ボツリヌス毒素（タイプ C1）中に含まれる ADP-リボース転移酵素 C3 により行った。*rhoB* p20 と *smg* p25A の大脳各画分における存在の有無は種々のクロマトグラフィーにより精製後、*smg* p25A に関してはその蛋白質に対するモノクローナル抗体によって、*rhoB* p20 に関しては利用できる抗体が無い場合 ADP-リボシル化によって同定した。

実験結果

ウシ大脳のコモジネートをまず P1 画分（核および細胞残渣）、P2 画分（ミエリン、ミトコンドリア、シナプトゾーム）、P3 画分（ミクロゾーム）、S 画分（細胞質）の 4 画分に分け、次に、P2 画分を P2A 画分（ミエリン、形質膜）、P2B 画分（小胞体、ゴルジ体）、P2C 画分（主としてシナプトゾーム）、P2D 画分（主としてミトコンドリア）の 4 画分に分けた。そして P2C 画分をさらに CSM 画分（粗シナプス膜）、CSV 画分（粗シナプス小胞）、SS 画分（シナプス内細胞質）に分け、各画分の G 蛋白質の総量を調べた。その結果、まずコモジネートでは組織 1g あたり約 35nmol の G 蛋白質が存在し、そのうち P1 画分に 13%、P2 画分に 44%、P3 画分に 25%、S 画分に 18% 存在し、比活性は、蛋白質 1mg あたり P1 画分が 0.26nmol、P2 画分が 0.38 nmol、P3 画分が 0.52 nmol、S 画分が 0.26 nmol であった。次に、P2A、P2B、P2C、P2D の各画分での G 蛋白質の分布は、P2A 画分が 15%、P2B 画分が 11%、P2C 画分が 41%、P2D 画分が 33% であり、その比活性は P2C 画分が 0.52 nmol と最も高かった。さらに、CSM 画分、CSV 画分、SS 画分での G 蛋白質の分布は、CSM 画分が 67%、CSV 画分が 3%、SS 画分が 30% であり、その比活性は CSV 画分が 0.80 nmol と最も高かった。以上のことから、大脳の中ではシナプスに G 蛋白質が多量に存在することが明らかとなった。

次に、シナプス内での *rhoB* p20、*smg* p25A の局在を調べるために、CSM 画分と SS 画分をそれぞれウルトロゲル 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 等の種々のカラムクロマトグラフィーにより低分子量 G 蛋白質の精製を行った。その結果、*smg* p25A は CSM 画分と SS 画分の両方に存在し、*rhoB* p20 は CSM 画分には存在するが、SS 画分には存在しないことが判明した。なお、CSV 画分の G 蛋白質はその総量が極めて少量のため精製できなかった。

考 察

本研究において、*ras* p21、*rhoB* p20、*smg* p25A シナプス内分布に関し、*ras* p21 と *rhoB* p20 はシナプスの膜画分には存在するが可溶性画分には存在しないこと、一方、*smg* p25A はその両方に存在することが明らかとなった。

ras p21 は多くの哺乳動物に見い出されており、細胞の形質転換作用を含めさまざまな細胞機能の制御に関与していることが知られている。とりわけ、神経組織に最も多く存在し、神経機能に関し重

要な役割を果たしていることを示す多くの証拠がある。例えば、褐色細胞腫 PC12 細胞に活性型 *ras* p21 をマイクロインジェクションすると、PC12 細胞が神経細胞様細胞に分化するという事実などその良い例である。このように、*ras* p21 が神経細胞においてその分化の誘導や機能の制御に重要な役割を果たしていることを示したいいくつかの事実と、本蛋白質がシナプス膜に最も多いと言う事実との関連は注目に値する。

一方、*rhoB* p20 に関しては、本研究で *rhoB* p20 が、ボツリヌス毒素の菌体外酵素である ADP-リボース転移酵素 C3 により ADP-リボシル化されることを明らかにしている。*rhoB* p20 の ADP-リボース転移酵素 C3 による ADP-リボシル化反応の生理的意義は不明であるが、最近、C3 を線維芽細胞や PC12 細胞にマイクロインジェクションすると、*ras* p21 によって引き起こされるのと同様の形態変化が起こるという報告がある。以上のことと、*ras* p21 と *rhoB* p20 が同じ細胞内局在を示しという事実から、*rhoB* p20 も神経細胞の分化や機能の制御に関与している可能性がある。いずれにせよ、ボツリヌス毒素は *rhoB* p20 の機能を明らかにする手段となると考えられる。

他方、*smg* p25A については、先に本研究で PC12 細胞に神経栄養因子やサイクリック AMP を作用させた後に *smg* p25A mRNA 量を測定すると、PC12 細胞の神経細胞様細胞への形態変化に伴って *smg* p25A mRNA 量が刺激後 4-7 日で増加することを明らかにしている。本研究でこの低分子量 G 蛋白質がウシ大脳の膜画分および可溶性画分の両方に存在することが明らかになったが、これらのことより *smg* p25A もまた神経機能の制御に関与している可能性が強い。

以上のように、本研究によって、その細胞内局在特にシナプス内局在を詳細に検討した 3 つの低分子量 G 蛋白質は、各々細胞内で極めて重要な機能を果たしていると考えられ、本研究がその機能を解明する為の糸口となりうると考えられる。

論文審査の結果の要旨

哺乳類の細胞膜には、細胞膜受容体のトランスデューサーとして働く一群の GTP 結合蛋白質（高分子量 G 蛋白質）が存在する。これらの G 蛋白質は $\alpha\beta\gamma$ の 3 量体構造をとり分子量は約 8 万である。一方、哺乳類組織にはこれらの高分子量 G 蛋白質以外に、分子量約 2 万の *ras* 癌遺伝子産物（*ras* p21）類似の G 蛋白質（低分子量 G 蛋白質）の一群が存在する。この一群の低分子量 G 蛋白質をコードする遺伝子は 20 種類以上見い出されており、最近その産物の細胞機能の制御における重要性が注目されている。特に、低分子量 G 蛋白質の多くが大脳に多量に分布していることから、その神経機能の制御との関係に関心が払われている。これら低分子量 G 蛋白質のうち、本研究室にて、*c-Ki-ras* p21, *rhoB* p20, *smg* p25A などがウシ大脳膜画分よりほぼ均一にまで精製されているが、本研究ではこれら 3 つの低分子量 G 蛋白質の機能を解明する第一歩としてそのシナプス内での分布をウシ大脳を用いて検討している。

本研究者はウシ大脳の細胞分画法を Ueda らの方法に従って行い、各画分における GTP 結合蛋白質の総量を ^{35}S で標識された GTP γS を用いて調べている。それによると、まずホモジネート 1 g あ

たり約35 nmol の G 蛋白質が存在し、そのうち P 1 画分に13%、P 2 画分に44%、P 3 画分に25%、S 画分に18%の G 蛋白質が存在していた。次に、P 2 A、P 2 B、P 2 C、P 2 D の各画分では P 2 A 画分に15%、P 2 B 画分に11%、P 2 C 画分に41%、P 2 D 画分に33%の G 蛋白質が存在していた。さらに、CSM、CSV、SS の各画分では、CSM 画分に67%、CSV 画分に 3 %、SS 画分に30%の G 蛋白質が存在し、大脳の中ではシナプスに G 蛋白質が多量に存在することを明らかにしている。次に本研究者はシナプス内での *rhoB* p20、*smg* p25A の局在を調べるため種々のカラムクロマトグラフィーにより CSM 画分、SS 画分の低分子量 G 蛋白質の精製を行っている。その結果、*smg* p25A は CSM 画分と SS 画分の両方に存在し、*rhoB* p20は CSM 画分には存在するが、SS 画分には存在しないことを明らかにしている。

以上、本研究は *ras* p21、*rhoB* p20、*smg* p25A という 3 つの低分子量 G 蛋白質について、そのシナプス内分布を研究したものであるが、従来全く行われていなかった低分子量 G 蛋白質と、神経機能の制御との関係について重要な知見を得たものとして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。