Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

The Posttranslationally Modified C-terminal Structure of Bovine Aortic Smooth Muscle rhoA p21

片山，正哉

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1993-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1193
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001193

※ 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。

〔 86 〕

氏名・（本籍）	片山正哉（かたやま まさや）　（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学位記番号	博い第843号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成5年3月31日
学位論文題目	The Posttranslationally Modified C-terminal Structure of Bovine Aortic Smooth Muscle *rho*A p21 **ウシ大動脈平滑筋 *rho*A p21 のC末端構造とその翻訳後修飾の解析**
審査委員	主査　教授　高井義美 教授　横山光宏　教授　片岡　徹

論文内容の要旨

［目的］

rho p21 は分子量約 21,000 の低分子量 GTP 結合蛋白質（G蛋白質）で、*rho* A, B, C の 3 種類の遺伝子が知られている。*rho* p21 は細胞骨格系を介して細胞形態の維持に関係していることが他の研究室から報告されていたが、本研究室では、*rho* p21 はさらに平滑筋の収縮や、細胞運動、細胞質分裂をも制御していることを明らかにしており、*rho* p21 が細胞骨格系を介する種々の細胞機能を制御していることが明らかになりつつある。

rho p21 には GDP 結合型の不活性型と GTP 結合型の活性型がある。不活性型から活性型へは GDP／GTP 交換反応によって変換され、活性型から不活性型へは内在性の GTPase 活性により変換される。それぞれの反応は GDP／GTP exchange protein（GEP）と GTPase activating protein（GAP）によって制御されている。本研究室では、*rho* p21 に対する GEP として、促進に働く *smg* GDS（GDP dissociation stimulator）と *rho* GDS 、および制御に働く *rho* GDI（GDP dissociation inhibitor)を見出している。

一般に低分子量G蛋白質はC末端にユニークなアミノ酸配列を有しているが、*rho* p21 も Cys-A-A-X（A：脂肪族アミノ酸、X：任意のアミノ酸）配列を有している。*ras* p21 では翻訳後にまずこの Cys にファルネシル基がチオエーテル結合し、次に A-A-X 部分がプロテアーゼにより除かれ、最後に Cys のカルボキシル基がメチル化されることが明らかになっている。また、*ras* p21 においてはこの翻訳後修飾が細胞膜への結合とトランスフォーメーション活性に必須であることが明らかにされている。*rho* p21 も翻訳後修飾を受け、その修飾が *rho* p21 の機能に重要であると考えられるが、そ

の実体は不明であった。そこで今回、ウシ大動脈平滑筋より精製した *rho*A p21 のC末端の翻訳後修飾を解析した。

［方法］

（1）*rho*A p21 のC末端構造の解析

1）Sf9 細胞における[^{3}H]メバロン酸による *rho*A p21 の標識

*rho*A p21 を発現した Sf9 細胞を[^{3}H]メバロン酸で標識し、ホモジネート、膜画分および可溶性画分を SDS-PAGE で分析し、*rho*A p21 に取り込まれた放射活性をフルオログラフィーによって検出した。また、2次元電気泳動により同様の分析を行った。

2）*rho*A p21 の NaOH、KOH および CH_3I 処理

ウシ大脳可溶性画分より精製した *rho*A p21 を NaOH、KOH あるいは CH_3I にて処理し、C_4 逆相カラムで分離し、蛋白質ピークを 210nm の吸光度で判定し SDS-PAGE によって分析した。

3）GC／MS 分析

精製した *rho*A p21 をラニーニッケルで処理し、ペンタンにて抽出された脂質を GC／MS で分析した。水素添加はラニーニッケル処理後の抽出物をプラチナで処理した後、ペンタンにて抽出された脂質を GC／MS で分析した。

4）ペプチドマップおよびアミノ酸配列の分析

精製した *rho*A p21 を AP1 で消化し、C_8 逆相カラムでペプチドを分離した後、アミノ酸シークエンサーにて分析した。また、AP1 消化した後、メチル基を除去するため KOH 処理し、同様の分析を行った。

（2）翻訳後修飾の順序の決定

1）大腸菌に発現させた *rho*A p21 のウシ大脳可溶性画分によるゲラニルゲラニル化

大腸菌に発現させたC末端の3つのアミノ酸 Leu-Val-Leu^{193} を有する *rho*A p21 と、有さない *rho*A p21 を[^{3}H]ゲラニルゲラニルピロリン酸とウシ大脳可溶性画分と共にインキュベートした後、*rho*A p21 に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測した。

2）合成C末端ペプチドのウシ大脳膜画分によるメチル化

Leu-Val-Leu^{193} を欠きかつゲラニルゲラニル基を有する *rho*A p21 のC末端10個のペプチドと、ゲラニルゲラニル基を有さないペプチドを合成し、ウシ大脳膜画分と[^{3}H]アデノシルメチオニンと共にインキュベートし、これらのペプチドに取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測した。また、メチル化したペプチドを AP1 で消化した後、C_8 逆相カラムで分析して放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測した。

［結果］

（1）*rho*A p21 のC末端構造の解析

1）Sf9 細胞における[^{3}H]メバロン酸による *rho*A p21 の標識

*rho*A p21 を発現した Sf9 細胞のホモジネートおよび膜画分では *rho*A p21 が[^{3}H]メバロン酸によって標識された。

2）*rho*A p21 の NaOH、KOH および CH_3I 処理

精製した *rho*A p21 を NaOH あるいは KOH 処理してもその溶出時間は変化しなかった。しかし、*rho*A p21 を CH_3I 処理すると溶出時間が短縮した。このことより、*rho*A p21 にはチオエーテル結合するイソプレノイドが存在することが示唆された。

3）ラニーニッケル処理した *rho*A p21 の GC／MS 分析

精製した *rho*A p21 より遊離したイソプレノイドの溶出時間およびフラグメントパターンは trans-2,6,10,14-tetramethy1-2,6,10,14-hexa-dacatetraene に一致した。さらに、ペンタン抽出物を水素添加すると溶出時間およびフラグメントパターンは phytane に一致した。すなわち、*rho*A p21 はチオエーテル結合によってゲラニルゲラニル化されていることが示された。

4）ゲラニルゲラニル化部位

精製した *rho*A p21 を AP1 処理した後 C_8 逆相カラムで分析すると、そのC末端のペプチドは cDNA より推測される配列から Leu-Val-Leu^{193} が除去されていた。また、精製した *rho*A p21 の AP1 消化ペプチドを KOH 処理後 C_8 逆相カラムで分析すると、そのC末端ペプチドのピークはシステインで終わるゲラニルゲラニル化合成ペプチドのピークに一致した。すなわち、*rho*A p21 はC末端の3つのアミノ酸が除去されており末端のシステイン（Cys^{190}）がゲラニルゲラニル化されていることが示された。

5）カルボキシメチル化部位

合成したゲラニルゲラニル化C末端ペプチドは、[^{3}H]アデノシルメチオニンによってメチル化された。また、メチル化した合成C末端ペプチドを C_8 逆相カラムで分析すると、精製した *rho*A p21 のピークに一致した。すなわち、C末端のシステインがメチル化されていることが示された。

（2）翻訳後修飾の順序

大腸菌に発現させたC末端の3つのアミノ酸 Leu-Val-Leu^{193} を有する *rho*A p21 はウシ大脳可溶性画分によってゲラニルゲラニル化されたが、有さない *rho*A p21 はゲラニルゲラニル化されなかった。すなわち、ゲラニルゲラニル化された後、C末端の3つのアミノ酸が除去されることが示された。C末端の3つのアミノ酸を有さない合成ペプチドのうち、ゲラニルゲラニル化されたペプチドはウシ大脳膜画分によってメチル化されたが、ゲラニルゲラニル化されていないペプチドはメチル化されなかった。以上の結果より、*rho*A p21 はゲラニルゲラニル化され、次にC末端の3つのアミノ酸が除去されて最後にメチル化されることが示された。

［考案］

本研究は、ウシ大動脈平滑筋より精製した *rho*A p21 のC末端のシステイン（Cys^{190}）がゲラニルゲラニル化およびカルボキシメチル化され、さらにC末端の3つのアミノ酸が除去されていることを示した。これは他の Cys-A-A-X を持つ蛋白質、*rho*dotorucineA、tremerogen α-13、tremerogenA-9291-1、yeast α-factor、rhs p21、laminB、$\alpha\beta\gamma$ タイプのG蛋白質の γ サブユニット等の結果と一致する。このうち、$\alpha\beta\gamma$ タイプのG蛋白質の γ サブユニット、*smg* p21、G25K はゲラニルゲラニル化されているが、他の蛋白質はファルネシル化されている。本研究室では以前ゲラニルゲラニル

化されるかファルネシル化されるかを決めるのはC末端のアミノ酸であると報告した。すなわち、Cys-A-A-X のうち最後のXが Leu か Phe であればゲラニルゲラニル化され、他のアミノ酸ならばファルネシル化される。この原則は *rho*A p21 においても一致した。さらに、*rho*A p21 のC末端の修飾がC末端のシステインがまずゲラニルゲラニル化され、次にC末端の3つのアミノ酸が除去され、最後にこのシステインがカルボキシメチル化されることを証明した。これは酵母の α-factor におけるC末端の修飾の順序に一致する。

本研究による *rho* p21 の翻訳後修飾の決定に基づいて、その後本研究室で、この修飾が GDP／GTP 交換反応制御蛋白質である *smg* GDS、*rho* GDS、*rho* GDI の活性に必要であることを明らかにしている。また、*rho* p21 が平滑筋の収縮や細胞の形態維持や運動、細胞質分裂を制御するためにも、その翻訳後修飾が必要であることも明らかにしている。このように、本研究の研究成果は、*rho* p21 の翻訳後修飾の機能の解明において多大な貢献をしている。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

rho p21 は分子量約 21,000 の低分子量 GTP 結合蛋白質（G蛋白質）で、*rho*A, B, C の 3 種類の遺伝子が知られている。*rho* p21 は細胞骨格系を介して細胞形態の維持に関係していることが他の研究室から報告されていたが、本研究室では、*rho* p21 はさらに平滑筋の収縮や、細胞運動、細胞質分裂をも制御していることを明らかにしており、*rho* p21 が細胞骨格系を介する種々の細胞機能を制御していることが明らかになりつつある。

rho p21 には GDP 結合型の不活性型と GTP 結合型の活性型がある。不活性型から活性型へは GDP／GTP 交換反応によって変換され、活性型から不活性型へは内在性の GTPase 活性により変換される。それぞれの反応は GDP／GTP exchange protein（GEP）と GTPase activating protein（GAP）によって制御されている。本研究室では、*rho* p21 に対する GEP として、促進に働く *smg* GDS（GDS dissociation stimulator）と *rho* GDS、および制御に働く *rho* GDI（GDP dissociation inhibitor）を見出している。

一般に低分子量G蛋白質はC末端にユニークなアミノ酸配列を有しているが、*rho* p21 も Cys-A-A-X（A：脂肪族アミノ酸、X：任意のアミノ酸）配列を有している。*ras* p21 では翻訳後にまずこの Cys にファルネシル基がチオエーテル結合し、次に A-A-X 部分がプロテアーゼにより除かれ、最後に Cys のカルボキシル基がメチル化されることが明らかになっている。また、*ras* p21 においてはこの翻訳後修飾が細胞膜への結合とトランスフォーメーション活性に必須であることが明らかにされている。*rho* p21 も翻訳後修飾を受け、その修飾が *rho* p21 の機能に重要であると考えられるが、その実体は不明であった。　本研究は、GC／MS 分析および合成したゲラニルゲラニル化C末端ペプチドとの比較によって、ウシ大動脈平滑筋より精製した *rho*A p21 のC末端のシステイン（Cys190）がゲラニルゲラニル化およびカルボキシメチル化され、さらにC末端の3つのアミノ酸が除去されていることを示している。さらに、大腸菌に発現させた *rho*A p21 のウシ大脳可溶性画分によるゲラニ

ルゲラニル化および合成C末端ペプチドのウジ大脳膜画分によるメチル化によって、翻訳後修飾の順序を決定している。すなわち、*rho*A p21のC末端のシステインがまずゲラニルゲラニル化され、次にC末端の3つのアミノ酸が除去され、最後にこのシステインがカルボキシメチル化されることを証明している。

本研究による*rho* p21の翻訳後修飾の決定に基づいて、その後本研究室で、この修飾がGDP／GTP交換反応制御蛋白質である*smg* GDS、*rho* GDS、*rho* GDIの活性に必要であることを明らかにしている。また、*rho* p21が平滑筋の収縮や細胞の形態維持や運動、細胞質分裂を制御するためにも、その翻訳後修飾が必要であることも明らかにしている。以上、本研究では従来全く行なわれていなかった牛大動脈平滑筋の*rho*A p21のC末端構造の研究をすることにより、*rho*A p21の生理活性を解明するための重要な手掛かりとなる構造を明らかにした点で価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。