



Role of the C-terminal Region of smg p21, a ras p21-like small GTP-binding Protein, in Membrane and smg p21 GDP/GTP Exchange Protein Interactions (ras p21類似低分子量GTP結合蛋白質、

廣吉, 基己

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1993-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1195

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001195>

※ 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）	ひろよしもと き 廣 吉 基 己	（鳥取県）
博士の専攻分野の名称	博 士（医学）	
学位記番号	博い第845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	Role of the C-terminal Region of <i>smg</i> p21, a <i>ras</i> p21-like Small GTP-binding Protein, in Membrane and <i>smg</i> p21 GDP/GTP Exchange Protein Interactions <i>ras</i> p21 類似低分子量 GTP 結合蛋白質、 <i>smg</i> p21 の細胞膜および GDP/GTP 交換反応調節蛋白質との結合における C 末端領域の役割	
審 査 委 員	主査 教授 高 井 義 美 教授 尾 原 秀 史	教授 斎 藤 洋 一

論 文 内 容 の 要 旨

〔序文〕

smg p21 は分子量約 22,000 の *ras* p21 類似低分子量 GTP 結合蛋白質（G 蛋白質）である。*smg* p21 は互いに極めて類似した A、B の 2 種類が存在しており、共に 184 個のアミノ酸からなる。また、*smg* p21 は他の低分子量 G 蛋白質と同様に GDP/GTP 結合活性や GTPase 活性を示す。*smg* p21 は *ras* p21 のエフェクター部位と同じアミノ酸配列を有していることから、*smg* p21 はそれ固有の機能以外に *ras* p21 と同じかあるいは拮抗する作用があると考えられる。

smg p21 には *ras* p21 と同様に GDP 結合型の不活性型と GTP 結合型の活性型が存在し、GTP 結合型から GDP 結合型への転換は内在性の GTPase により、GDP 結合型から GTP 結合型への転換は GDP/GTP 交換反応により行われる。これらの反応を調節する蛋白質として、GTPase 活性促進蛋白質（GTPase activating protein, GAP）と GDP/GTP 交換反応を促進する蛋白質（GDP dissociation stimulator, GDS）の存在が明らかになっている。

低分子量 G 蛋白質はその C 末端側にシステイン残基を含むユニークなアミノ酸配列を有している。*smg* p21 は *ras* p21 と同様 Cys-A-A-X（A は脂肪族アミノ酸、X は任意のアミノ酸）という C 末端側のアミノ酸配列を有している。*smg* p21 は翻訳後、C 末端側のシステイン残基にチオエーテル結合によりゲラニルゲラニル基が結合し、次いで A-A-X 部分がプロテアーゼで取り除かれ、さらにシステイン残基のカルボキシル基がメチル化される。この C 末端の翻訳後修飾が *ras* p21 と同様に *smg* p21 の細胞膜への結合に重要な役割を果たしていると推定される。

本研究では、*smg* p21 をトリプシン限定分解により N 末端フラグメントと C 末端フラグメントに

分離して各フラグメントの機能を解析することにより、*smg p21* の C 末端構造の生理的意義を明らかにすることを目的とした。

[実験方法]

1) 材料

smg p21B はヒト血小板の膜画分から、*smg p21GAP* と *smg GDS* はウシ大脳の細胞質画分からそれぞれ精製した。また、*smg p21B* をそれぞれ $1 \mu\text{M}$ の $[^3\text{H}]\text{GDP}$ 、 $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ と 30°C で 20 分間インキュベートし、GDP 結合型と GTP 結合型の *smg p21B* を調整した。

2) *smg p21B* のトリプシン限定分解

smg p21B をトリプシンにて 30°C で 1 時間処理し、N 末端フラグメントと C 末端フラグメントを作成した。

3) *smg p21B* と膜との結合

$[^3\text{H}]\text{GDP}$ あるいは $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ と結合した *smg p21B* をシナプス膜やホスファチジルセリン (PS) - アフィゲルと共に 4°C で 5 分間インキュベートし、遠心分離後、上清と沈渣に存在する *smg p21B* を定量した。

4) 活性測定方法

$[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ 結合活性は *smg p21B* と $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ を 30°C でインキュベートし、*smg p21B* に結合する $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ 量を定量して測定した。GTPase 活性は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ 結合型 *smg p21B* をまず調整し、この蛋白質からの ^{32}Pi の遊離を定量して測定した。GAP 活性は *smg p21B* の GTPase 活性を促進する活性を定量して測定した。GDS 活性は *smg p21B* からの $[^3\text{H}]\text{GDP}$ の解離や *smg p21B* への $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ の結合を促進する活性を定量して測定した。

[実験結果]

1) *smg p21B* の生体膜への結合

smg p21B とシナプス膜をインキュベートした後、遠心分離すると、 $[^3\text{H}]\text{GDP}$ 結合型、 $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ 結合型とも *smg p21B* はシナプス膜と結合して大部分沈渣に回収された。煮沸したりトリプシンで処理したシナプス膜でも同様の結果が得られた。シナプス膜のかわりにミトコンドリア、赤血球膜や PS-アフィゲルを用いても、*smg p21B* はこれらの膜や PS-アフィゲルに結合した。

2) *smg p21B* のトリプシン限定分解

smg p21B をトリプシンで限定分解すると、時間依存性に分子量約 20,500 の N 末端フラグメントと分子量 1,000 以下の C 末端フラグメントが産生された。

3) C 末端フラグメントのシナプス膜への結合

まず、*smg p21B* をトリプシンで限定分解して N 末端フラグメントと C 末端フラグメントに分離した後、 $[^3\text{H}]\text{GDP}$ とインキュベートし、 $[^3\text{H}]\text{GDP}$ の結合した N 末端フラグメントを作製した。これをシナプス膜とインキュベートした後、遠心分離すると、放射活性は大部分上清に回収された。次に、

smg p21B の C 末端フラグメントを標識する目的で、*smg* p21B を [γ - 32 P]ATP の存在下でサイクリック AMP 依存性プロテインキナーゼによってリン酸化した。このリン酸化部位は C 末端フラグメントに含まれるセリン¹⁷⁹であることが同定されているが、実際、リン酸化された *smg* p21B をトリプシンで処理すると、N 末端フラグメントは 32 P で標識されなかったが、C 末端フラグメントは 32 P で標識された。これをシナプス膜とインキュベートし、遠心分離すると、 32 P で標識された C 末端フラグメントは大部分沈渣に回収された。シナプス膜のかわりに PS-アフィゲルを用いても同様の結果が得られた。

4) N 末端フラグメントの GDP/GTP 結合活性と GTPase 活性

N 末端フラグメントも *smg* p21B と同様の GDP/GTP 結合活性および GTPase 活性を示したが、C 末端フラグメントは GDP/GTP 結合活性も GTPase 活性も示さなかった。

5) N 末端フラグメントに対する GAP と GDS の効果

smg p21GAP は N 末端フラグメントの GTPase 活性を *smg* p21B と同程度促進した。*smg* GDS は *smg* p21B からの [3 H]GDP の解離や *smg* p21B への [35 S]GTP γ S の結合を促進したが、N 末端フラグメントからの [3 H]GDP の解離や N 末端フラグメントへの [35 S]GTP γ S の結合は促進しなかった。

[考察]

本研究では、*smg* p21B の C 末端領域の翻訳後修飾の役割を検討する目的で、*smg* p21B をトリプシン限定分解により N 末端フラグメントと C 末端フラグメントに分離して各フラグメントの機能を解析した。その結果、N 末端フラグメントは *smg* p21B と同様の GDP/GTP 結合活性や GTPase 活性を示したが、C 末端フラグメントはどちらの活性も示さなかった。次に、生体膜への結合能を検討したところ、C 末端フラグメントは結合したが、N 末端フラグメントは結合しなかった。さらに、活性調節蛋白質である GAP や GDS の作用を比較したところ、これらの蛋白質が *smg* p21B に作用する条件下で、GAP は N 末端フラグメントに作用したが、GDS は作用しなかった。以上の結果から、GDP/GTP 結合活性や GTPase 活性、GAP の作用には C 末端領域は必要ではないが、膜との結合や GDS の作用には C 末端領域の翻訳後修飾が不可欠であることが明らかとなった。

従来、蛋白質の翻訳後修飾が細胞膜の脂質二重層との結合に重要な役割を果たすことが知られていた。しかし、今回の実験結果から、翻訳後修飾が膜との結合のみならず蛋白質どうしの相互作用にも重要な役割を果たすことが判明した。

論文審査の結果の要旨

smg p21 は *ras* p21 類似低分子量 GTP 結合蛋白質のひとつで、細胞の分化や増殖において重要な役割を果たしていると考えられている。*smg* p21 の活性制御機構や作用機構は不明であったが、最近、GAP や GDS のような活性制御蛋白質が分離精製され、これらの蛋白質によって *smg* p21 の GDP/GTP 交換反応が調節されていることが明らかになっている。また、最近、低分子量 GTP 結

合蛋白質C末端領域が翻訳後にリピドによる修飾を受け、その修飾が蛋白質の機能発現に必須であることが示唆されている。本研究者は *smg p21B* をトリプシン限定分解によりN末端フラグメントとC末端フラグメントに分けて各フラグメントの機能を解析している。その結果、C末端領域の翻訳後修飾は *smg p21B* の GDP/GTP 結合活性や GTPase 活性には影響しないことを明らかにしている。次に、本研究者は生体膜への結合能を検討し、C末端フラグメントは結合するが、N末端フラグメントは結合しないことを明らかにしている。さらに、活性調節蛋白質である GAP や GDS の作用を比較して、これらの蛋白質が *smg p21B* に作用する条件下で、GAP はN末端フラグメントに作用するが、GDS は作用しないことも見いだしている。以上の結果から、本研究者は *smg p21B* のC末端領域の翻訳後修飾が膜との結合のみならず GDS のような GDP/GTP 交換反応調節蛋白質との結合にも不可欠であることを証明している。従来、蛋白質の翻訳後修飾が細胞膜の脂質二重層との結合に重要であることが知られていたが、今回の実験結果から、翻訳後修飾が膜との結合のみならず蛋白質どうしの相互作用にも重要な役割を果たすことが明らかとなった。したがって、本研究は低分子量 GTP 結合蛋白質のひとつである *smg p21B* が膜と結合する際や GDP/GTP 交換反応調節蛋白質と結合する際にC末端領域の翻訳後修飾が不可欠であることを初めてしめしたものであり、価値のある集積と考えられる。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。