



Molecular Cloning and Characterization of Two rab GDI Species from Rat Brain : Brain-specific and Ubiquitous Types

西村，範行

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1995-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1354

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001354>

※ 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)	にしむらのりゆき 西村範行	(愛知県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博い第941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7年3月31日	
学位論文題目	Molecular Cloning and Charaterization of Two rab GDI Species from Rat Brain: Brainspecific and Ubiquitous Types (2種のラット脳由来Rab GDI cDNAクローニング: 脳特異型及び普通型)	
審査委員	主査教授 中村肇 教授 松尾雅文 教授 山村博平	

論文内容の要旨

I. はじめに

最近、酵母から哺乳動物に至まで、エンドサイトーシス・エキソサイトーシス・トランスサイトーシスといった細胞内小胞輸送は、Rabファミリーを中心とする一群の低分子量GTP結合蛋白質によって制御されていることが明らかになりつつある。Rabファミリーは、既に30種類以上同定され、各々が特定の細胞内膜区画に結合していることが示されている。その結果、細胞内小胞輸送の特異性をRabファミリーが規定している可能性が推定されている。

小胞輸送におけるRab蛋白質の作用機構として次のようなモデルが提唱されている。すなわち、1) GDP結合型の不活性型Rab蛋白質は、細胞質に存在している。2) GTP結合型の活性型に変換されたRab蛋白質は、小胞に存在する標的蛋白質に結合する。3) Rab蛋白質の結合した小胞は、受手側の膜に向かって移動してアクセプター蛋白質に結合した後、小胞は膜と融合する。4) その後、Rab蛋白質は、GTP結合型からGDP結合型に変換される。5) GDP結合型Rab蛋白質は再び細胞質に戻り次の小胞輸送に備える。このように、小胞輸送においてRab蛋白質は、GDP結合型とGTP結合型の間を周期的に作用すると考えられている。

低分子量GTP結合蛋白質において、GDP結合型とGTP結合型との間の変換は、GDP/GTP交換反応とGTPase反応によって制御されている。GDP/GTP交換反応は、促進的に働くGDP解離促進蛋白質(GDS)と抑制的に働くGDP解離抑制蛋白質(GDI)によって、またGTPase反応は、GTPase活性促進蛋白質(GAP)によって、それぞれ制御されている。

現在RabGDIは、ウシ・ヒト及びショウジョウバエから同定されており、それらのアミノ酸配列は種を越えて高度に保存されている。Rab蛋白質は翻訳後修飾によりC末端側にゲラニルゲラニル基が結合するが、RabGDIはこの翻訳後修飾を受けたRab蛋白質のみに作用する。RabGDIはGDP結合型Rab蛋白質と複合体を形成してGDP/GTP交換反応を抑制するが、GTP結合型Rab蛋白質とは複合体を形成しない。GTP結合型Rab蛋白質と、GDP結合型Rab蛋白質は、ともにC末

端側のゲラニルゲラニル基を介して細胞膜に結合している。RabGDIの存在下では、GTP結合型 Rab蛋白質はRabGDIと複合体を形成してゲナリルゲナリル基が遮蔽され膜に結合できない。また、一度膜に結合したGDP結合型Rab蛋白質は、RabGDIと複合体を形成して膜から解離する。このようにRabGDIはGDP/GTP交換反応ばかりでなく、Rab蛋白質の膜と細胞質との間の移動をも制御している。

Rabファミリーが既に30種類以上同定されているのに対し、RabGDIは、今まで1種類しか同定されておらず、ウシRabGDIはRab1A,-2,-3A,-4B,-5A,-7,-8,-9,-10,-11蛋白質に作用することが示されている。しかし、ウシRabGDIcDNAをプローベとしたラットのノザンプロット解析では、調べた全ての組織に約2.3kbのバンドを認め、更に脳特異的に約3.1kbのもう一つのバンドを認めた。本研究において、この脳特異的RabGDIをラットからクローニングし、“気質であるRabファミリーと同様RabGDIもファミリーを形成し、各々が特異的な役割を担っている”という仮説を検証することを試みた。

II. 実験方法と結果

1. ラットRabGDI α & β のクローニング及び塩基配列の決定

ウシRabGDIのラットでの相同分子を得るために、ラット脳cDNAライブラリー20万クローンをウシRabGDIcDNAをプローベとしてスクリーニングした。8ヶの陽性クローンが得られ、それらはプローベとのハイブリダイゼーション・シグナルの強度から2グループに分けられた。強いシグナルの6クローンの塩基配列を決定すると、分子量50,517の447アミノ酸をコードする1,341塩基長のcDNAが得られ、これをラットRabGDI α と名づけた。弱いシグナルの2クローンの塩基配列を決定すると、ラットRabGDI α とは異なるcDNAをコードしており、これをラットRabGDI β と名づけた。ラットRabGDI β cDNAの全長を得るために、更にラット脳cDNAライブラリー40万クローンをスクリーニングした。4ヶの陽性クローンが得られ、その塩基配列を決定したところ、5'領域を欠いていたので、5'RACEを行った。その結果、分子量50,681の445アミノ酸をコードする1,335塩基長のラットRabGDI β cDNAが得られた。

2. ラットRabGDI α 及び β の一次構造の特徴

ラットRabGDI α 及び β のアミノ酸配列は、ウシ、ヒト及びショウジョウバエの間で高度に保存されており、ウシRabGDIに対してそれぞれ99%及び86%の同一性を示し、ヒトRabCDIに対してそれぞれ87%及び94%の同一性を示した。また、ラットRabGDI α 及び β のアミノ酸配列は、4ブロックにおいてREP(Rab Escort Protein)とアミノ酸の相同性を示した。

3. ラットRabGDI α 及び β のGDI活性

得られたcDNAがコードする蛋白質が実際にGDI活性を持つことを確かめるために、ラットRabGDI α をグルタチオン-S-転移酵素(GST)との、ラットRabGDI β をマルトース結合蛋白質(MBP)との融合蛋白質として、それぞれ大腸菌で産生した。RabGDIの基質として、ウシ大脳から精製したRab3A蛋白質と、昆虫細胞で産生したRab11蛋白質を用いた。ラットRabGDI α 及び β は、Rab3A及びRab11蛋白質からのGDPの解離を用量依存性にウシRabGDIと同程度に抑制した。つまりラットRabGDI α 及び β は、確かにRab3AとRab11蛋白質に対してGDI活性を持っているが、各々の基質特異性に違いは認められなかった。

4. ラットRabGDI α 及び β mRNAの組織分布

ラットRabGDI α 及び β mRNAのラットの種々の組織における発現をノザンプロット解析した。その結果、約3.2kbのラットRabGDI α mRNAは主に大脳及び小脳に発現しており、一方、約2.4kbのラットRabGDI β mRNAは調べた全ての組織に発現していた。

5. ラットRabGDI α 及び β mRNAの全脳及びアストロサイトでの発現

ノザンプロット解析によると、ラット脳ではラットRabGDI α 及び β mRNAの両者が共に発現されている。そこで、ラットRabGDI α 及び β mRNAの全脳RNA及びアストロサイトRNAでの発現を、RT-PCRで調べた。その結果、ラットRabGDI α RNAは全脳RNAにだけ検出され、ラットRabGDI β mRNAは全脳RNA及びアストロサイトRNAの両方で検出された。

III. 結論

本研究よりRabGDIには、少なくとも2種類のアイソホームが存在することが明らかにされた。さらに、両アイソホームは、脳特異型(α -タイプ)と普通型(β -タイプ)という異なる組織局在を示した。神経系においては、脳特異型(α -タイプ)はニューロンにのみ存在するのに対し、普通型(β -タイプ)はニューロンおよびグリア双方に存在した。つまり、Rabファミリーと同様RabGDIもファミリーを形成しており、細胞内小胞輸送の特異性を規定するのに何らかの役割を果たしていると考えられる。RabGDIはRabファミリーの膜と細胞質間の移動の制御を介して細胞内小胞輸送を調節していると考えられるが、その正確な役割並びに両アイソホームの機能的な違いについては依然として不明であり、さらなる研究が必要である。RabGDIアイソホームとRabファミリー並びにその他の細胞内小胞輸送を担う蛋白質(NSF, SNAP, SNARE etc)との相互作用の詳細な検討から、細胞内小胞輸送の特異性について多くの事が明らかにされると期待される。

論文審査の結果の要旨

細胞内小胞輸送は、Rabファミリーを中心とする一群の低分子量GTP結合蛋白質によって制御されていることが明らかになり、既に30種類以上のRab蛋白質が同定されている。低分子量GTP結合蛋白質において、GDP結合型とGTP結合型との間の変換が、GDP/GTP交換反応とGTPase反応によってすなわち促進的に働くGDP解離促進蛋白質(GDS)，抑制的に働くGDP解離抑制蛋白質(GDI)及びGTPase活性促進蛋白質(GAP)によって制御されている。

Rabファミリーが既に30種類以上同定されているのに対し、RabGDIは今まで1種類しか同定されていない。申請者らは、ウシRabGDIcDNAをプローブとしたラットのノザンプロット解析を行い、調べた全ての組織に約2.3kbのバンドとともに、更に脳にのみ約3.1kbのもう一つのバンドの存在を見い出した。本研究においては、“気質であるRabファミリーと同様に、RabGDIもファミリーを形成し、各々が特異的な役割を担っている”という仮説を検証する目的で、この脳特異的RabGDIをラットからクローニングし、その解析を試みた。

実験方法は、ウシRabGDIのラットでの相同分子を得るために、ラット脳cDNAライブラリー20万クローリングをウシRabGDIcDNAをプローブとしてスクリーニングし、その結果分子量50,517の447アミノ酸をコードする1,341塩基長のラットRabGDI α cDNAと分子量50,681の445アミノ酸をコードする1,335塩基長のラットRabGDI β cDNAを得ている。

得られたラットRabGDI α 及び β のアミノ酸配列は、ウシ、ヒト及びショウジョウバエの間で高

度に保存されており、その一次構造はウシ及びヒト RabCDI と高い相同生を示した。また、得られたcDNAがコードする蛋白質はRab3A及びRab11蛋白質に対してGDI活性を持つが、基質特異性に違いは明らかではなかった。ラットRabGDI α 及び β mRNAの組織分布を明らかにするため、ノーザンプロット解析を行ったところ、ラットRabGDI β は調べた全ての組織に発現していたが、ラットRabGDI α は大脳、小脳に発現しているもののアストロサイトでは検出されず、ニューロンにのみ存在している可能性を示唆するデータを示した。

本研究は、低分子量GTP結合蛋白質に抑制的に働くGDP解離抑制蛋白質、GDIについて、少なくとも2種類のアイソホームが存在することを明らかにしたものであり、従来ほとんど行われなかつたアイソホームの存在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、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。