



Purification and Characterization of Rab GDI β from Rat Brain

荒木, 敬司

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1638

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001638>

※ 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）	荒 木 敬 司 (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1093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9年3月31日
学位論文題目	Purification and Characterization of <i>RabGDI β</i> from Rat Brain (ラット大脳からの <i>RabGDI β</i> 蛋白質の精製とその機能解析)

審査委員	主査 教授 市 橋 正 光
	教授 山 村 博 平 教授 片 岡 徹

論文内容の要旨

目的：

生体内には、分子量が2万から3万でサブユニット構造を有しない一群の低分子量GTP結合蛋白質と呼ばれるファミリーが存在している。この低分子量G蛋白質をコードする遺伝子は哺乳動物から酵母に至るまで50種類以上報告されており、それぞれの低分子量G蛋白質が種々の細胞機能制御において極めて重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。この内、*Rab*ファミリーはエキソサイトーシスやエンドサイトーシスなどの細胞内小胞輸送の制御に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。高井らは、この*Rab*ファミリーに属する*Rab3A*と*Rab3A*の活性制御蛋白質である*RabGDI α*（以下*RabGDI α*と呼ぶ）をウシ大脳に見出し、それぞれの一次構造を決定している。*RabGDI α*は*Rab3A*だけでなく、ほとんどの*Rab*ファミリーのメンバーに作用する。又、*RabGDI α*は翻訳後修飾を受けたGDP結合型の*Rab*にのみ作用し、GTP結合型の*Rab*や翻訳後修飾を受けていないGDP結合型*Rab*には作用しない。また、GDIは低分子量G蛋白質を細胞膜に結合するのを抑制し、さらに、細胞膜に結合した低分子量G蛋白質を細胞膜から解離させる作用も有している。従ってある種の低分子量G蛋白質は細胞膜と細胞質との間をトランスロケーションし、GDIがこのトランスロケーションを制御していると考えられている。

最近、私どもを含めたいくつかのグループが*RabGDI α*のホモログを見い出している。すなわち、脳に多く発現し、他の組織にあまり発現していない*RabGDI α*と、いろいろな組織に発現している*RabGDI β*の2種類が存在する。

今回、私どもはラットのシナプトソーム可溶性画分より、GDP結合型の*Rab3A*に対してGDP解離抑制活性（以下GDI活性と略す）を示すが、*RabGDI α*の抗体では認識されない蛋白質をいくつかのカラムクロマトグラフィーを用いて高度に精製し、その性状解析を行った。

方法：

1, *RabGDI*活性の測定法（GDIアッセイ）

[3H]GDPとバキュロウイルスの発現系を用いてsf9細胞に発現させ精製した*Rab3A*をプレインキュ

ベートして作成された複合体からの[3H]GDPの解離抑制活性をニトロセルロースを用いたフィルターアッセイ法により測定した。

2, 新しいRabGDI蛋白質の精製法

ラット大脳のシナプトゾーム可溶性画分から、Q-セファロース、ハイドロキシアパタイト、Mono Qカラムクロマトグラフィーを用いて新しいRabGDIを高度に精製した。精製のためのアッセイ方法は前述のGDIアッセイを用いた。

3, アミノ酸配列の解析法

精製した新しいRabGDI (20 μ g) を0.4mgのAchromobacter protease Iで処理した後、Bakerbond WP C8カラムによって20以上のペプチドに分離し、そのうち2つのピークにつきアミノ酸配列を解析した。

4, 新しいRabGDIとRab3Aのcomplex formation

翻訳後修飾を受けた75pmolのをRab3Aと[3H]GDPないしは[35S]GTP γ Sとの複合体を作り、それらが300pmolの新しいRabGDIとcomplexを形成するか否かをRabGDI α を指標として検討した。[3H]GDP結合型の75pmolのRab3Aと300pmolの新しいRabGDIならびにRabGDI α の複合体をショ糖密度勾配法にて遠心分離し、各フラクションに対しGDIアッセイ並びに鍍銀染色を行った。

5, 新しいRabGDIによるRab3Aの細胞質と膜の間における移動制御

新しいRabGDIが、細胞質と膜の間における翻訳後修飾を受けたRab3Aの移動を制御しているか否かを検討した。[3H]GDP結合型のRab3Aと各濃度の新しいRabGDIないしはRabGDI α を先にインキュベートしてから赤血球膜を加えて遠心し可溶性画分と膜画分に分け、各々の[3H]GDPの放射活性を測定した。又、逆に[3H]GDP結合型のRab3Aと赤血球膜をさきにインキュベートしたのち、各濃度の新しいRabGDIないしはRabGDI α を加えて同様の遠心並びに測定をおこなった。

結果:

1, 蛋白質の精製

Q-セファロースカラムの結果、フラクション33から42とフラクション43から63の2つのGDI活性のピークが認められたため、この活性がRabGDI α によるものか否かを判定する目的でRabGDI α の抗体を用いウエスタンブロットを行った。この結果、セカンドピークに相当するフラクション43から63にのみRabGDI α が認められたためフラクション33から42を集めてハイドロキシアパタイトカラムにかけ、同様にGDI活性を測定したところoneピークとなったためそのフラクションを採取し、Mono Qカラムに投入し50-250mMまでNaClにてlinear gradientをかけGDI活性を測定し、そのピークフラクションを採取した。この様にして、SDS-PAGE上、分子量約4万6千の均一の蛋白質を精製できた。RabGDI α が分子量約5万4千であるのに対し、ピークフラクションは4万6千の高さにバンドがみられ、しかもそれはRabGDI α の抗体では認識されなかったため、この得られた蛋白質を新しいRabGDIと考えた。

2, アミノ酸配列の解析

2つのペプチドにつきアミノ酸配列の解析を行った所、ラットRabGDI β の58-74, 30-54番目の塩基配列と完全に一致したため精製したRabGDIをラットRabGDI β と同定した。

3, ラットRabGDI β の基質特異性と翻訳後修飾の必要性の検討

基質特異性であるが、ラットRabGDI β はRabGDI α と同様に、翻訳後修飾を受けたRab3AやRab11からのGDPの解離を抑制した。しかもこの反応は、量依存性であり、それに必要な量のラッ

トRabGDI β はRabGDI α のそれと同等であった。又翻訳後修飾の必要性に関しては、ラットRabGDI β はRabGDI α と同様に翻訳後修飾を受けたRab3Aには活性を持つが、翻訳後修飾を受けていないRab3Aにはまったく活性を持たなかった。

4, ratRabGDI β とRab3Aのcomplex formation

翻訳後修飾を受けた75pmolのRab3Aと[3H]GDPないしは[35S]GTP γ Sとの複合体を作り、それらが300pmolのRabGDI β とcomplexを形成するか否かをRabGDI α を指標として検討した。[3H]GDP結合型のRab3Aないし[35S]GTP γ S結合型のRab3A単独では3万2千のところにそのピークがみられた。

[3H]GDP結合型のRab3Aを、また[35S]GTP γ S結合型のRab3Aを各々ラットRabGDI β あるいはRabGDI α とインキュベートしショ糖密度勾配法にて遠心した。その結果[3H]GDP結合型のRab3AのみがラットRabGDI β と複合体をつくり7万6千の位置に移動した。SDS-PAGEからRab3AとラットRabGDI β は各々2万5千、4万7千と評価されることからラットRabGDI β はGDP formの翻訳後修飾を受けたRab3Aとのみモル比1 : 1で複合体を形成すると考えられた。

5, RabGDI β によるRab3Aの細胞質と膜の間における移動制御

RabGDI β はRabGDI α と同様にGDP結合型の翻訳後修飾を受けたRab3Aの膜への結合を阻害した。又、RabGDI β は膜に結合したGDP結合型の翻訳後修飾を受けたRab3Aの膜からの解離を促進した。

考案：

ここで重要な問題は何故RabGDIに異なったアイソフォームが存在する必要があるかということである。最近、ラットとマウスから2つのアイソフォームのRabGDIのcDNAがクローニングされ順にRabGDI α , RabGDI β , RabGDI-1, RabGDI-2と名付けられた。RabGDI α とRabGDI-1はウシ大脳RabGDIのcounterpartと考えられている。RabGDI β とRabGDI-2は94%のホモロジーを有するが同じ蛋白質であるか否かはあきらかでない。文献的にはこれらのアイソフォームは異なった臓器分布や細胞内分布を示すことが報告されている。例えば、RabGDI α は脳にかなり特異的で他の臓器に殆ど見られないのに対しRabGDI β やRabGDI-2は脳だけでなく肺、肝、骨格筋、胎盤など広範囲の臓器にみられる。又、RabGDI α は細胞質側の蛋白質であるのに対しRabGDI-2は細胞膜質にもかなりの割合で認められる。これらの事実からはアイソフォームによって別々の機能があると考えられることも出来る。最近、RabGDI α がRabを細胞膜上にあるレセプターに運ぶ際にGDP, GTP交換反応がそれに伴って行われるという報告があり、GDIとGDP結合型Rabの複合体からGDIを引き離すファクターが存在するという仮説をとる研究者もある。これら未知のファクターが存在する場合、それらの蛋白質と各々のアイソフォームのGDIが異なった反応を起こすのかもしれない。

論文審査の結果の要旨

生体内には、分子量が2万から3万でサブユニット構造を有しない一群の低分子量GTP結合蛋白質（以下G蛋白質と略す）と呼ばれるファミリーが存在しており、それぞれの低分子量G蛋白質が種々の細胞機能制御において極めて重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。この内、Rabファミリーはエキソサイトーシスやエンドサイトーシスなどの細胞内小胞輸送の制御に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。高井らは、このRabファミリーに属するRab3Aと

*Rab3A*の活性制御蛋白質である*RabGDI*（以下*RabGDI* α と呼ぶ）をウシ脳に見出し、それぞれの一次構造を決定している。*RabGDI* α は*Rab3A*だけでなく、ほとんどの*Rab*ファミリーのメンバー（*Rab*）に作用する。*Rab*は他の低分子量G蛋白質と同様に脂質による翻訳後修飾を受けているが、*RabGDI* α は翻訳後修飾を受けたGDP結合型の*Rab*にのみ作用し、GTP結合型の*Rab*や翻訳後修飾を受けていないGDP結合型*Rab*には作用しない。また、*Rab*はGDP結合型およびGTP結合型が細胞膜に結合するが、*RabGDI*は*Rab*が細胞膜に結合するのを抑制し、さらに、細胞膜に結合した*Rab*を細胞膜から解離させる作用も有している。従って*RabGDI*は*Rab*の細胞膜と細胞質との間のトランスロケーションを制御していると考えられている。最近、私共を含めたいくつかのグループの研究から、ウシ脳*RabGDI*を基に、ラットとマウスより、各々、*RabGDI* α および*RabGDI* β と*RabGDI*-1および*RabGDI*-2の遺伝子が単離、報告されておりその一次構造上の違いから、*RabGDI*は、現在、*RabGDI* α （*RabGDI*-1）と*RabGDI* β 、*RabGDI**Rab*（*RabGDI*-2）の3つのアイソフォームから構成されていると考えられている。

本研究では、ラット脳のシナプトゾーム可溶性画分から、数段階のカラム操作を行うことにより、*Rab3A*に対してGDI活性を示すが、*RabGDI* α の抗体では認識されない分子量約4万6千の均一の蛋白質（新しい*RabGDI*）を精製できた。この精製した*RabGDI*の部分アミノ酸を決定したところ、*RabGDI* β であることが判明した。

元来、*RabGDI* α は脳特異的に発現しているのに対し、*RabGDI* β は脳だけでなく肺、肝、骨格筋、胎盤など広範囲の臓器に発現していることから、*RabGDI* β は*RabGDI* α と異なった機能を有する可能性がある。そこで、精製した*RabGDI* β を用いて、*RabGDI* β の基質特異性や基質の翻訳後修飾の必要性、*Rab3A*との複合体形成、*Rab3A*の細胞質と細胞膜の間におけるトランスロケーションの制御について*RabGDI* α と比較検討したが、これらの生化学的性状には*RabGDI* α と*RabGDI* β の間で相違が見られなかった。最近、*RabGDI*と複合体を形成したGDP結合型*Rab*が活性化される際に、*RabGDI*を*Rab*から解離させる因子の存在が示唆されており、この因子がアイソフォーム間で異なる可能性も考えられる。今後は、この点も含めて、*RabGDI*のアイソフォームの機能の違いを明らかにしていく必要がある。

本研究は、*RabGDI* β について、その生化学的性状を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった*RabGDI* β の機能的かつ分子生理学的機能について重要な治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。