



Multiple small molecular weight GTP-binding proteins in bovine brain cytosol : purification and characterization of A 24KDa protein

山本, 克彦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1992-09-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1659

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001659>

※ 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)	山本克彦 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博ろ第1320号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成4年9月9日
学位論文題目	MULTIPLE SMALL MOLECULAR WEIGHT GTP-BINDING PROTEINS IN BOVINE BRAIN CYTOSOL (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A 24KDa PROTEIN) ウシ大脳可溶性画分の低分子量 GTP 結合タンパク質の多様性 (分子量 2.4 万タンパク質の精製と性状)
審査委員	主査 教授 高井 義美 教授 片岡 徹 教授 井出 千束

論文内容の要旨

〔序文〕

分子量 2 万余りの GTP 結合タンパク質 (低分子量 G タンパク質) は、巨大なスーパーファミリーを形成しており、細胞の分化や増殖、細胞内情報伝達、細胞骨格の制御、小胞輸送およびスーパーオキシド産生など、種々の細胞機能の制御に関与している。低分子量 G タンパク質のうちで、smg p25 をはじめとする rab ファミリーは細胞内の小胞輸送を制御していることが明らかになりつつある。細胞内の小胞輸送は基本的には(1)小胞がドナー側の膜から出芽する過程 (budding)、(2)小胞がアクセプター側の膜を認識する過程 (targetting)、(3)小胞がアクセプター側の膜と融合する過程 (fusion) の3つの過程から構成されている。低分子量 G タンパク質は小胞の膜やドナー側の膜、アクセプター側の膜と細胞質との間を移動することによりドナー側の膜からアクセプター側の膜へ小胞を輸送すると考えられており、膜画分と可溶性画分の両面に低分子量 G タンパク質が存在すると推定されている。しかし、これまでのところほとんどの G タンパク質は膜画分から見出されている。そこで、本研究では可溶性画分における低分子量 G タンパク質について解析を行った。

〔実験方法〕

- (1) GTP γ S 結合活性の測定 — [35 S] GTP γ S と G タンパク質を 30°C、90 分間インキュベートし、G タンパク質に結合する [35 S] GTP γ S 量を測定した。
- (2) GTP $_{ase}$ 活性の測定 — [γ - 32 P] GTP と G タンパク質を 30°C、60 分間インキュベートし、遊離された 32 Pi 量を測定した。

(3)ニトロセルロース膜上のGタンパク質の検出 — SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 後、タンパク質を電気的に転写したニトロセルロース膜をウシ血清アルブミンを含む溶液中で 25°C、90 分間ブロッキングした。続いて、このニトロセルロース膜を〔 α -³²P〕 GTP を含む溶液中で 25°C、90 分間インキュベートした後、オートラジオグラフィーにてGタンパク質を検出した。

(4)ウェスタンブロッティング法 — (3)と同様に SDS-PAGE 後、電気的にタンパク質を転写したニトロセルロース膜をブロッキングした。このニトロセルロース膜を抗 smg p25A モノクローナル抗体を含む溶液中で 25°C、90 分間インキュベートし、洗浄後、抗マウス IgG-パーオキシダーゼ複合体を含む溶液中でさらに 37°C、60 分間インキュベートした。この後、呈色反応にて smg p25A を検出した。

〔結果〕

ウシ大脳をホモジナイズし、10 万×g、60 分間遠心を行い、得られた上清を可溶性画分とした。可溶性画分を DE-52、ウルトロゲル AcA-44、ハイドロキシアパタイトでカラムクロマトグラフィーを行い、Gタンパク質の精製を行った。DE-52、ウルトロゲル AcA-44 では GTP γ S 結合活性が 1 つのピークとして得られたが、ハイドロキシアパタイトでは 2 つのピークが得られた。一番目のピークをさらにモノ Q カラムクロマトグラフィーにて精製したところ、2 つの大きなピークと 3 つの小さなピークが得られた。これら 5 つのピークをそれぞれ SDS-PAGE し、ニトロセルロース膜上に転写した後、〔 α -³²P〕 GTP の結合を観察したところ、1 つのピークには分子量約 2.4 万の Gタンパク質が認められたが、他のピークでは分子量 2 から 3 万の複数の低分子量 Gタンパク質が認められた。

モノ Q カラムクロマトグラフィーで得られたこの分子量約 2.4 万の低分子量 Gタンパク質のピークをさらにモノ Q カラムクロマトグラフィーにて精製したところ、1 つのピークが得られ、また、このピークに含まれるタンパク質は SDS-PAGE 上単一のバンドとして精製された。このタンパク質の SDS-PAGE 上の分子量は膜画分から得られた smg p25A (膜 smg p25A) と等しく、逆相クロマトグラフィーにおける溶出時間も同一であった。また、本タンパク質は膜 smg p25A に対するモノクローナル抗体により認識された。本 Gタンパク質と膜 smg p25A との生化学的性状の解析を行ったところ、GTP γ S に対する解離定数、ヌクレオチド結合の特異性、GTPase 活性において両者に相違が認められなかった。また、N-エチルマレイミドは多くの低分子量 Gタンパク質の GTP γ S 結合活性を阻害することが知られているが、膜 smg p25A と本 Gタンパク質の GTP γ S 結合活性を阻害しなかった。以上のことから、本 Gタンパク質は可溶性画分に存在する smg p25A であることが明らかになった。

〔考察〕

膜画分に存在する低分子量 Gタンパク質には多様性があることが明らかになっているが、可溶性画分における Gタンパク質についてはほとんど解析されていなかった。本研究では、ウシ大脳可溶性画分から低分子量 Gタンパク質の分離・精製を試みた。可溶性画分の Gタンパク質はハイドロキシアパ

タイトカラムクロマトグラフィーによって2つに分離することができた。その1つはさらにモノQカラムクロマトグラフィーによって5つに分離することができた。この結果から、可溶性画分にも低分子量Gタンパク質の多様性があることが明らかになった。これらのGタンパク質のうち、1つは単一タンパク質にまで精製されたが、そのGタンパク質の物理化学的、生化学的、免疫学的性状はウシ大脳膜画分から精製されている膜 smg p25A と同じであり、smg p25A が膜画分と可溶性画分との両画分に存在することが明らかになった。

smg p25A のC末端側にはイソプレノイドの1つであるゲラニルゲラニル基が結合しており、smg p25A はこの脂質を介して膜に結合している。可溶性画分から得られた smg p25A は逆相クロマトグラフィーによる溶出時間から、非常に疎水性が高く、また膜 smg p25A と同じ溶出時間を示すことから、膜 smg p25A と同様にゲラニルゲラニル基が付加していると考えられる。このことは可溶性画分の smg p25A はゲラニルゲラニル基が解離して物理的に膜に結合できなくなったのではなく、他のタンパク質と複合体を形成して可溶性画分に存在していることを示唆している。最近、smg p25A のGDPの解離を抑制するタンパク質 (smg p25 GDI) が見出されているが、smg p25 GDI は smg p25A のゲラニルゲラニル基を介して smg p25A と複合体を形成するために、smg p25A の膜への結合を阻害することが明らかとなっている。本研究結果とこれらの知見を総合すると、smg p25A は smg p25 GDI と複合体を形成して可溶性画分に存在し、何らかの刺激により smg p25 GDI が解離すると smg p25A は膜画分に移動するものと考えられる。したがって、本研究の結果は低分子量Gタンパク質が膜画分と可溶性画分との間を移動することによって小胞輸送を制御するという仮説の1つの大きな証拠となった。

論文審査の結果の要旨

分子量2万余りのGタンパク質(低分子量Gタンパク質)は、種々の細胞機能の制御に関与していることが知られている。そのなかで、smg p25をはじめとする rab ファミリーは細胞内の小胞輸送を制御していることが明らかになりつつある。低分子量Gタンパク質は小胞の膜やドナー側の膜、アクセプター側の膜と細胞質との間をトランスロケートすることによりドナー側の膜からアクセプター側の膜へ小胞を輸送すると考えられており、膜画分と可溶性画分の両画分に低分子量Gタンパク質が存在すると推定されている。しかし、これまでのところほとんどのGタンパク質は膜画分から見出されており、可溶性画分における低分子量Gタンパク質についての知見はあまり得られていなかった。

本研究者は、ウシ大脳可溶性画分から低分子量Gタンパク質を分離、精製している。数種類のカラムクロマトグラフィーを組合わせて得られたタンパク質画分を電気泳動し、ニトロセルロース膜上に転写した後、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTPの結合を観察したところ、分子量の異なる複数の低分子量Gタンパク質の存在を確認している。また、本研究者はさらに精製を加え、一種類の低分子量Gタンパク質をSDS-PAGE上単一のバンドにまで精製し、このタンパク質の物理化学的、生化学的、免疫化学的性状がウシ大脳膜画分から精製されている膜 smg p25A と同じであり、smg p25A が膜画分と可溶性

画分との両画分に存在することを明らかにしている。

最近、smg p25A の GDP の解離を抑制するタンパク質 (smg p25 GDI) が見出されているが、smg p25 GDI は smg p25A のゲラニルゲラニル基を介して smg p25A と複合体を形成するために、smg p25A の膜への結合を阻害することが明らかになっている。本研究結果とこれらの知見を総合すると、smg p25A は smg p25 GDI と複合体を形成して可溶性画分に存在し、何らかの刺激により smg p25 GDI が解離すると smg p25A は膜画分にトランスロケートするものと考えられる。したがって、本研究の結果は低分子量Gタンパク質が膜画分と可溶性画分との間をトランスロケートすることによって小胞輸送を制御するという仮説の一つの大きな証拠を提供している。以上の事から、本研究は、従来ほとんど行われなかった可溶性画分の低分子量Gタンパク質についての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。