

Title	百日咳毒素感受性GTP結合調節蛋白質の質的変動
Author(s)	今泉, 太郎
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37156">https://hdl.handle.net/11094/37156</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 【 5 】

氏名・(本籍)	いま 今	いずみ 泉	た 太	ろう 郎
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9069	号	
学位授与の日付	平成	2年	3月	24日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	百日咳毒素感受性GTP結合調節蛋白質の質的変動			
論文審査委員	(主査) 教授	三木 直正		
	(副査) 教授	和田 博		
	(副査) 教授	祖父江憲治		

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

GTP結合蛋白質(G蛋白)は、多くの受容体と、それらと共役した反応系との間を仲介している。もしG蛋白に機能的な変化(質的変動)が生じるならば、生体膜を介する情報伝達機能が変化するので、生理的又は病態上、重要な意義を持つと考えられる。本研究では、サイクリックAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)によるG蛋白のリン酸化、及びリチウムイオンが、百日咳毒素(IAP)感受性G蛋白(特に阻害性G蛋白:Gi)に対して、どのように影響を与えるかを検討した。更に、三量体であるGiが機能するためには、そのサブユニットが解離することが必須であるので、Giのサブユニット解離に対するリン酸化、及びリチウムの影響を検討した。

## 〔方法〕

Giは、宇井らの方法によりラット脳より部分精製した。部分精製Giを、IAPによりADP-リボシル化反応後、SDS-ゲル電気泳動、オートラジオグラフィを行い、Gi(41K)蛋白のバンドをデントメーターにて測定し、IAPによるADP-リボシル化を定量した。PKAによるGiのリン酸化は、部分精製Giを10mM MgCl<sub>2</sub> 1mMγ-32P ATPの存在下で行った。Giの解離は、部分精製Giを、PKA処理(MgATP存在下)、或いは塩化リチウム(LiCl)にて、インキュベート後、シヨ糖密度勾配(5-20%)上に静置し、室温にて超遠心した。遠沈後、各分画を採取し、IAPによる41Kの蛋白バンドのADP-リボシル化を定量し、Giのサブユニットの解離状態を観察した。高親和性GTPase活性、及びアデニレートサイクラーゼ(AC)活性の測定は、ヒト血小板膜分画を用いて、各々Casselらの方法、Jakobsらの方法に従った。

## 〔結果〕

### 1) 部分精製GiのPKAによるリン酸化反応

MgATP 存在下で、リン酸化は、37℃にて5-10分にて飽和に達し、その量は約0.3 moles Pi / moles Giであった。

### 2) IAPによる部分精製GiのADP-リボシル化に対する、PKAによるGiリン酸化、及びLiCl添加の影響

PKAによるGiのリン酸化、或いはLiCl(2mM)存在下では、部分精製GiのIAPによる、ADP-リボシル化量は有意に減少した。

### 3) Gi蛋白のサブユニット間の解離に対するリン酸化及びLiClの影響

部分精製Gi(41K)を10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATPの存在下でPKAによりリン酸化した後、シヨ糖密度勾配法を行い、Giの $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -サブユニットの解離を調べたところ、Gi三量体の解離は認められなかった。更に50mM MgCl<sub>2</sub>, 100 $\mu$ M GTP $\gamma$ SによるGi三量体の解離も、Giのリン酸化により抑制された。一方、LiCl添加は、Gi三量体の解離にも、50mM MgCl<sub>2</sub>, 100 $\mu$ M GTP $\gamma$ SによるGi三量体の解離にも影響しなかった。

### 4) 受容体刺激GTPase活性に対するリン酸化及びLiClの影響

ヒト血小板膜分画を用いて、アドレナリン(Ad)による $\alpha$ 2-受容体刺激による高親和性GTPase活性の増加に対するPKA処置、及びLiCl添加の影響を調べた。PKAによるリン酸化条件下では、基礎活性は増加したが、Ad刺激による活性上昇は抑制された。一方、LiCl添加は、GTPase活性に著明な影響を与えなかった。

### 5) Giを介するAC活性阻害に対するリン酸化及びLiClの影響

ヒト血小板膜分画を用いて、Ad 10 $\mu$ M添加によるフォルスコリン(Forskolin:Fors)刺激AC活性阻害に対するLiCl添加の影響を調べたところ、反応液中にLiClを添加すると、Fors(10 $\mu$ M)刺激AC活性は有意に変化しなかったが、Fors刺激に対するAdによる阻害は抑制された。一方、PKAによるリン酸化条件下では、Fors刺激AC活性化、及びAdによるFors刺激AC活性化の阻害、GTP(0.1-30 $\mu$ M)刺激によるAC活性化は、著明な影響を受けなかった。

## 〔総括〕

PKAにより、Giはリン酸化された。その条件下では、MgGTP $\gamma$ SによるGiの $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -サブユニットの三量体からの解離抑制、 $\alpha$ 2-受容体刺激による高親和性GTPase活性上昇抑制、更に、基礎活性の上昇が観察された。一方、分化HL-60細胞を用いた実験では、PKAによるリン酸化条件下において、Giを介する共役反応系(GTP $\gamma$ SによるGi刺激によるフォスホリパーゼC活性)が阻害されたという結果を得ているが、ヒト血小板膜Giを介する共役反応系( $\alpha$ 2受容体刺激によるAC活性阻害)に対しては、PKA処置は著明な影響をもたらさない。この差異は、関与するGi蛋白のサブタイプの相違や、Giと連関する共役反応系の相違によると考えられる。この様に、GiはPKAによるリン酸化を受ける事により、サブユニットへの解離抑制を伴う機能変化が生じると考えられた。一方、LiCl添加では、 $\alpha$ 2-

受容体刺激によるAC活性阻害の減弱が観察されたが、Giの $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -サブユニットへの解離や、高親和性GTPase 活性には有意な変化が認められなかった。この様に、Gi 蛋白は、ある種の条件下で、共役反応に関与する酵素蛋白質との連関に変動をもたらす質的変動（機能変化）を生じ、その変動には、その三つの $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -サブユニットの解離の変化を伴う場合と伴わない場合があると示唆された。

## 論文の審査結果の要旨

本論文では、生体膜受容体を介する情報伝達の調節の機作の解明のために、GTP結合(G)蛋白質（特に阻害性G蛋白質：Gi 蛋白質）の変動を果敢に研究した。その結果、サイクリックAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)によるGi 蛋白質のリン酸化、並びに、同蛋白質へのリチウム添加が、Gi 蛋白質の情報伝達機能を低下させ、特に、前者の場合には、その三量体の解離の変化を伴うことを発見した。この様なGi 蛋白質の機能変化の分子レベルにおける証明は、同時にG蛋白質変動の一つとして、質的変動が生じるという概念を初めて打ち立てたものであり、異種性脱感作などのメカニズムを探る上においても、薬物療法中にしばしば経験する薬剤耐性のメカニズムを知る上でも、この研究は非常に重要な意味をもつ。

以上の理由から、本論文は学位論文として十分価値あるものと評価された。