

Title	A Stimulatory GDP/GTP Exchange Protein for Smg p21 Is Active on the Post-translationally Processed Form of c-Ki-Ras p21 and RhoA p21
Author(s)	水野, 敬和
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39642
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	水野敬和
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 12007 号
学位授与年月日	平成 7 年 5 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	A Stimulatory GDP/GTP Exchange Protein for <i>Smg</i> p21 Is Active on the Post-translationally Processed Form of c-Ki-Ras p21 and <i>RhoA</i> p21 (<i>Smg</i> p21 の GDP/GTP 交換反応促進蛋白質による翻訳後修飾を受けた c-Ki-Ras および <i>RhoA</i> の活性化)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 平野 俊夫 教授 谷口 直之

論文内容の要旨

【目的】

生体内には癌遺伝子産物 *Ras* に類似する分子量約 2 万の低分子量 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) が数多く存在し、細胞機能の制御に深く携わっている。これらの低分子量 G 蛋白質は GDP/GTP 交換反応によって GDP 結合型の不活性型から GTP 結合型の活性型へと変換される。従って、この GDP/GTP 交換反応を促進するような因子は低分子量 G 蛋白質の活性化を介して細胞内情報伝達系の制御に重要な役割を果たすものと推察される。私どもは低分子量 G 蛋白質 *Rap1* / *Smg* p21 に対して GDP/GTP 交換反応を促進する *Smg* GDS を見出し、そのアミノ酸配列をもとに cDNA をクローニングすることに成功している。本研究では、*Rap1* 以外の低分子量 G 蛋白質を用いて *Smg* GDS の基質特異性を検討すると共に、*Smg* GDS と低分子量 G 蛋白質との複合体形成についての検討を行なうことを目的とした。さらに、低分子量 G 蛋白質は C 末端システイン残基のファルネシル化あるいはゲラニルゲラニル化などの翻訳後修飾を受けることが知られており、*Smg* GDS の作用に対する翻訳後修飾の影響を併せて検討した。

【方法ならびに成績】

- 1) *Smg* GDS および低分子量 G 蛋白質の精製 *Rap1* をヒト血小板より、c-Ki-Ras および *Rab3A* / *Smg* p25A をウシ大脳より、*RhoA* をウシ平滑筋より、また、リコンビナント *Smg* GDS を過剰発現させた大腸菌よりそれぞれ精製した。さらに、*Rap1B*、c-Ki-Ras4B、c-Ha-Ras および *RhoA* の各 cDNA をトランスファーベクター pAcYM1 に組み込んだ後、バキュロウィルス発現系を用いて各リコンビナント蛋白質を昆虫細胞 Sf9 に過剰発現させた。Sf9 細胞をメバロン酸存在下で培養した後、膜画分と可溶性画分からそれぞれ翻訳後修飾を受けた低分子量 G 蛋白質と未修飾の低分子量 G 蛋白質を MonoQ 陰イオン交換カラムを用いて精製した。Sf9 細胞をあらかじめ [³H] メバロン酸でラベルすると、膜画分より精製した低分子量 G 蛋白質のみ ³H の取り込みが認められ、翻訳後修飾をうけていることが示された。
- 2) *Smg* GDS 基質特異性 動物細胞より精製した *Rap1*、c-Ki-Ras、*RhoA* および *Rab3A*、あるいは Sf9 細胞の膜画分より精製した c-Ki-Ras をあらかじめ [³H] GDP でラベルし、*Smg* GDS 添加後に [³H] GDP の解離促進反応

を測定した。また, *Smg GDS* 存在下に各低分子量 G 蛋白質への [³⁵S] GTP γ S の取り込み促進反応を測定した。その結果, *Smg GDS* は *Rap1* と同様に *c-Ki-Ras* と *RhoA* に対して GDP/GTP 交換反応促進作用を示すことが明らかになった。*Smg GDS* は *c-Ha-Ras* および *Rab3A* には作用を示さなかった。これらの反応は *Smg GDS* と低分子量 G 蛋白質の濃度および反応時間に依存性であった。

3) *Smg GDS* の作用と翻訳後修飾 Sf9 細胞より精製した修飾あるいは未修飾のリコンビナント *Rap1*, *c-Ki-Ras* および *RhoA* を用いて *Smg GDS* の GDP/GTP 交換反応促進作用を検討した。その結果, *Smg GDS* は動物細胞より精製した低分子量 G 蛋白質と同様に修飾を受けたリコンビナント蛋白質に対しても GDP/GTP 交換反応を促進したが, 未修飾の低分子量 G 蛋白質に対しては作用を示さなかった。

4) *Smg GDS* と低分子量 G 蛋白質の複合体形成 動物細胞より精製した *Rap1*, *c-Ki-Ras* および *RhoA*, あるいは翻訳後修飾を受けたこれらのリコンビナント蛋白質はショ糖密度勾配遠心による分画で, 高分子量の位置に凝集されるかもしくは回収されなかった。これらをあらかじめ *Smg GDS* とインキュベートした後に分画すると, 分子量 7.4 万に相当する画分に回収され, *Smg GDS* と複合体を形成することが示された。一方, 未修飾のリコンビナント *Rap1*, *c-Ki-Ras* および *RhoA* は凝集せずに分子量約 2 万に相当する画分に回収されたが, *Smg GDS* とインキュベートしても回収位置は変化せず, 複合体の形成は認められなかった。

【総括】

本研究の結果, *Rap1* の GDP/GTP 交換反応促進蛋白質 *Smg GDS* は *c-Ki-Ras* および *RhoA* にも作用し, この時, 低分子量 G 蛋白質の翻訳後修飾が *Smg GDS* の GDP/GTP 交換反応促進作用に重要であることが明らかとなった。また, これらの低分子量 G 蛋白質は翻訳後修飾を受けることで *Smg GDS* と複合体を形成することが示された。*Smg GDS* はこの複合体形成により低分子量 G 蛋白質を細胞膜より遊離させる作用を持っており, 低分子量 G 蛋白質の機能との関連が期待される。さらに, 私どもは *Smg GDS* が *Rac* や *Cdc42* といった低分子量 G 蛋白質にも作用することを見出しており, *Smg GDS* が多くの低分子量 G 蛋白質の制御に携わっていることが明らかになってきている。近年, *Ras* 特異的な GDP/GTP 交換反応促進蛋白質 *Sos* による *Ras* の活性化機構が判明し, 細胞内情報伝達系における重要性が目ざされている。*Smg GDS* についても, その活性化機構や作用機構の解析が低分子量 G 蛋白質を介する細胞機能の解明の糸口になるものと考えている。

論文審査の結果の要旨

本申請者は, 本研究により *Rap1* 低分子量 G 蛋白質の活性制御蛋白質である *Smg GDS* をウシ大脳より精製し, その cDNA をクローニングしてその一次構造を決定した。また, *Smg GDS* が *Rap1* 以外に癌遺伝子産物 *Ki-Ras* を始め *Rho*, *Rac*, *mCdc42* に作用することを明らかにすると共に, *Smg GDS* の作用にはこれらの低分子量 G 蛋白質の翻訳後修飾が必要であることを示した。さらに, 実際, *Smg GDS* は細胞内で *Ki-Ras* を活性化して細胞増殖を制御すること, および, *Rac* を活性化してスーパーオキシドの産生を制御することを明らかにした。

低分子量 G 蛋白質は種々の重要な細胞機能を制御していることから, *Smg GDS* はそれらの細胞機能の制御に重要な働きをしていると考えられる。したがって, 本研究は今後の発展性や生命科学への貢献度から, 学位授与に十分値すると思われる。