The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| 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。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【 27 】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 水野敬和（みずの たかかず） |
| 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 *Smg* p21 Is Active on the Post－translationally Processed Form of c－Ki－*Ras* p21 and *Rho*A p21<br>(*Smg* 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*Rho*Aの活性化) |
| 論文審査委員 | (主査)<br>教授 高井 義美<br>(副査)<br>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*Rap*1／*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，*Rap*1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) <u>*Smg* GDSおよび低分子量G蛋白質の精製</u>　*Rap*1をヒト血小板より，c－Ki－*Ras*および*Rab*3A／*Smg* p25Aをウシ大脳より，*Rho*A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，*Rap*1B, c－Ki－*Ras*4B, c－Ha－*Ras* および*Rho*A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［$^3$H］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$^3$H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) <u>*Smg* GDS基質特異性</u>　動物細胞より精製した*Rap*1, c－Ki－*Ras*, *Rho*Aおよび*Rab*3A，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［$^3$H］GDPでラベルし，*Smg* GDS添加後に［$^3$H］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［$^{35}$S］GTPγSの取り込み促進反応を測定した。その結果，*Smg* GDSは*Rap*1 と同様にc－Ki－*Ras*と*Rho*A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*Rab*3A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） <u>*Smg* GDSの作用と翻訳後修飾</u>　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*Rap*1，c－Ki－*Ras*および*Rho*A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） <u>*Smg* GDSと低分子量G蛋白質の複合体形成</u>　動物細胞より精製した*Rap*1，c－Ki－*Ras*および*Rho*A，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とインキュー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*Rap*1，c－Ki－*Ras*および*Rho*A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，*Rap*1 のGDP／GTP交換反応促進蛋白質*Smg* GDSはc－Ki－*Ras*および*Rho*A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注目されている。*Smg* GDSに関しても，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*Rap*1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*Rap*1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サイ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考える。