



Title	A Membrane-associated GDP/GTP Exchange Protein Specific for Rho Small GTP-binding Protein : Partial Purification and Characterization from Rat Brain
Author(s)	松田, 修二
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40061">https://hdl.handle.net/11094/40061</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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">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

氏名	松田修二
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第12981号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	A Membrane-associated GDP/GTP Exchange Protein Specific for Rho Small GTP-binding Protein -Partial Purification and Characterization from Rat Brain (細胞膜結合型低分子量GTP結合蛋白質Rho特異的GDP/GTP交換反応促進蛋白質-ラット脳からの部分精製と性状解析)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美
	(副査) 教授 谷口 直之 教授 米田 悅啓

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

低分子量GTP結合蛋白質スーパーファミリーの中のRhoファミリーはRho, Rac, Cdc42サブファミリー(Rho, Rac, Cdc42)から構成されている。このうち、Rhoはアクチン細胞骨格系を介して細胞形態や細胞運動、細胞質分裂などを制御していることが明らかになっている。Rhoには、GDP結合型の不活性型とGTP結合型の活性型が存在する。GDP結合型からGTP結合型への変換は、GDP/GTP交換反応によって行われるが、この反応を促進するGDP/GTP交換反応促進蛋白質(GEP)と、抑制するGDP解離抑制蛋白質(GDI)によって制御されている。私共の研究室では、Rho GDIを見出している。Rho GDIは、Rho以外にRacとCdc42にも作用する。また、Rho GDIはGDP結合型Rhoと複合体を形成して細胞質に存在している。最近、私共の研究室では、Rhoが、細胞膜にransloケーションし、そこでERM-CD44系に作用してアクチングリメントと細胞膜との結合を制御していることを明らかにしている。したがって、細胞質でRho GDIと複合体を形成しているGDP結合型Rhoは、細胞膜に存在するRhoに特異的なGEPによって活性化されて細胞膜にransloケーションするという活性化機構が考えられる。RhoのGEPとしては、私共の研究室では、Smg GDSが、他の研究室では、Dbl, Ost, Tiam-1などが見出されているが、これらのGEPはすべてRho以外にRacやCdc42にも作用し、その多くは細胞質に存在している。

そこで、本研究では、細胞膜に存在し、Rhoに特異的なGEP(mRho GEP)の精製を試みた。

#### 【方法ならびに成果】

##### 1) 材料の調製

低分子量GTP結合蛋白質の多くは脂質による翻訳後修飾を受けている。RhoとRacのメンバーのうち、RhoAおよびRac1の翻訳後修飾を受けた標品、および受けていない標品は、バキュロウイルス発現系を用いて、大量発現したSf9細胞の膜画分、および細胞質画分からそれぞれ精製した。Rhoファミリー以外の低分子量GTP結合蛋白質のうち、Ki-RasやRab3Aの翻訳後修飾を受けた標品も、同様にSf9細胞の膜画分から精製した標品を用いた。mRho GEPは、ラット大脳粗シナプス膜をCHAPSおよびNaClの共在下で可溶化した画分から精製した。

##### 2) GEP活性の測定法

GEP 活性の測定には、翻訳後修飾を受けた RhoA と Rac1 を用いた。GEP 活性は、あらかじめ [<sup>3</sup>H] GDP を結合させた RhoA または Rac1 からの [<sup>3</sup>H] GDP の解離の促進か、あるいは、RhoA または Rac1 への [<sup>35</sup>S] GTP $\gamma$ S の結合の促進を指標に測定した。

### 3) mRho GEP の精製

最初に、ラット大脳粗シナプス膜 CHAPS/NaCl 可溶性画分をセファロース CL-6B ゲルろ過カラムを用いて分画し、GEP 活性を測定した。3つの活性画分が検出され、それぞれ分子量は約4万、20万、および400万であった。約4万と400万の活性画分は、RhoA にのみ GEP 活性を示したが、約20万の活性画分は、RhoA と Rac1 のどちらにも GEP 活性を示した。本研究では、最も GEP 活性が強く、RhoA に特異的な約4万の活性画分を、さらに、フェニルセファロース HP カラム、ハイドロキシアパタイトカラムを連続して用いて分画し、mRho GEP の精製を進めた。

### 3) mRho GEP の性状解析

ハイドロキシアパタイトカラムの活性画分を部分精製標品 mRho GEP として、mRho GEP の性状を生化学的に解析した。mRho GEP は、RhoA からの GDP の解離と、RhoA への GTP $\gamma$ S の結合を時間依存性および用量依存性に促進した。また、mRho GEP は、RhoA には作用したが、Rac1 や Ki-Ras, Rab 3A には作用しなかった。さらに、mRho GEP の活性には、RhoA の翻訳後修飾を必要とした。また、Rho GDI の共存下では、mRho GEP は GEP 活性を示さなかった。

## 【総括】

本研究では、細胞膜に存在する mRho GEP を、ラット大脳粗シナプス膜画分から部分精製することに成功した。mRho GEP は、RhoA に対して特異的に作用したが、最近、Dbl のホモログとして見い出されている Lbc も Rho に特異的に GEP 活性を示すことが報告されている。Lbc の分子量は約4万で、ゲルろ過法により測定した mRho GEP の分子量にはほぼ等しい。しかし、mRho GEP は翻訳後修飾を受けた RhoA にのみ作用したが、Lbc は翻訳後修飾を受けていない RhoA にも作用する。また、mRho GEP は脳に活性が認められたが、Lbc は脳には発現しておらず、血球系や骨格筋、心筋、肺に発現している。したがって、mRho GEP は Lbc とは異なった新しい Rho GEP である可能性が高い。さらに、本研究で、mRho GEP は、Rho GDI の共存下では、RhoA に作用できないことが明らかになった。私共の研究室では、現在までに報告されている GEP のうち、Dbl もまた、Rho GDI の共存下では、RhoA に作用できないことを明らかにしている。したがって、Rho が GEP によって活性化されるためには、何らかの機構によって Rho が Rho GDI から解離する必要がある。今後は、mRho GEP をさらに均一の蛋白質にまで精製し、その cDNA をクローニングして一次構造を決定すると共に、Rho が Rho GDI から解離する機構を明らかにすることが、Rho の活性化機構を解明するために必要である。

## 論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究において、ラット大脳粗シナプス膜画分から、細胞膜に存在する Rho の活性化蛋白質 (mRho GEP) を部分精製し、その性状を解析した。その結果、mRho GEP は、RhoA に対して特異的に作用すること、また、その作用は RhoA の翻訳後修飾を必要とするこを明らかにした。さらに、本研究で、mRho GEP は、Rho GDI の共存下では、RhoA に作用できないことを明らかにし、Rho が GEP によって活性化されるために、Rho が Rho GDI から解離する何らかの機構の必要性を示唆した。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究といえる。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。