

Title	Isolation and Characterization of a GTPase Activating Protein Specific for the Rab3 Subfamily of Small G Proteins
Author(s)	福井, 浩司
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40701
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	福井浩司
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13720号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Isolation and Characterization of a GTPase Activating Protein Specific for the Rab3 Subfamily of Small G Proteins (低分子量G蛋白質 Rab3サブファミリーに特異的な GTPase 活性促進蛋白質の精製と性状解析)
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次 (副査) 教授 高井 義美 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

【目的】

最近, Rab3A 低分子量G蛋白質が神経伝達物質の放出において重要な機能を果たしていることが確定しつつある。現在, 神経伝達物質の放出における Rab3A の作用機構は次のように考えられている。静止時のプレシナプスでは, Rab3A は GDP 結合型の不活性型として Rab GDI (GDP dissociation inhibitor) と複合体を形成し, 細胞質に存在している。何らかの機序で GDI が解離すると Rab3 GEP (GDP / GTP exchange protein) が作用し, 活性型である GTP 結合型に転換される。GTP 結合型がシナプス小胞に局在する Rabphilin-3A に結合すると, シナプス小胞はプレシナプス膜の Ca^{2+} チャンネルが局在するアクティブゾーンに運ばれ, ドッキングする。その後, プレシナプスに Ca^{2+} が流入すると, シナプス小胞とプレシナプス膜が融合して神経伝達物質の放出が起こり, これらの作用が終了すると, GTP 結合型 Rab3A は Rab3 GAP (GTPase activating protein) によって GDP 結合型に転換され, 再び Rab GDI と複合体を形成して細胞質に戻ると考えられている。

この Rab3 GAP については, 米国バーモント大学の Macara らのグループによって, ラット大脳の可溶性画分にその活性が認められていたが, その蛋白質の本体は同定されていなかった。そこで, 本研究では, Rab3 GAP を精製してその cDNA をクローニングし, 一次構造を決定するとともにその性状を解析した。

【方法ならびに成績】

1) Rab3 GAP 活性の測定

GAP 活性の測定には翻訳後修飾を受けた Rab3A を用いた。GAP 活性はあらかじめ Rab3A に [γ - ^{32}P] GTP を結合させ, 結合した [γ - ^{32}P] GTP の水解促進活性を指標に測定した。

2) Rab3 GAP の精製

ラット大脳シナプス可溶性画分を Qセファロースカラムを用いて分画し, GAP 活性を測定した。その活性画分をハイドロキシアパタイトカラム, ヘパリンセファロースカラム, および MonoQ カラムを連続して用いて分画し, Rab3 GAP を精製した。Rab3 GAP の精製標品には分子量130kDa と150kDa の2つの蛋白質が認められた。

3) Rab3 GAP の性状解析(1)

Rab3 GAP は翻訳後修飾を受けた Rab3A には GAP 活性を示したが、翻訳後修飾を受けていない Rab3A には GAP 活性を示さなかった。さらに、Rab3A, -3B, -3C, -3D から構成される Rab3 サブファミリーには GAP 活性を示したが、Rab2, -5A, -11 などの他の Rab ファミリーのメンバーには GAP 活性を示さなかった。

4) Rab3 GAP の cDNA のクローニング

Rab3 GAP の精製標品を用いてオーバーレイアッセイを行ったところ、130kDa の蛋白質に GAP 活性が認められた。そこで、Rab3 GAP の精製標品の SDS-PAGE を行い、130kDa の蛋白質をゲルから切り出してリシルエンドペプチダーゼで処理した後、C18 逆相カラムを用いてペプチドマッピングを行った。さらに、分画された 30 個以上のペプチドのうち、4 個のペプチドのアミノ酸配列を決定した。これらのアミノ酸配列に基づいてヒト大脳の cDNA ライブラリーより Rab3 GAP の cDNA のクローニングを行い、その一次構造を決定した。その結果、Rab3 GAP は 981 アミノ酸よりなる分子量 110,521 の蛋白質であることが明らかになった。

5) Rab3 GAP の組織内分布

ヒトの種々の組織より得られた mRNA を用いて Rab3 GAP の cDNA 全長をプローブにしてノザンプロットを行ったところ、Rab3 GAP の mRNA は各組織に広く分布していることが明らかになった。

6) リコンビナント Rab3 GAP の作製とその性状解析

Rab3 GAP の cDNA の全長 2,946 塩基対を pRSET のベクターに組み込み、大腸菌に His6-Rab3 GAP を発現させた。ニックルカラムを用いて精製したリコンビナント Rab3 GAP は、確かに Rab3A に対して GAP 活性を示したが、Rab3 GAP の精製標品に比べるとその分子活性は 1/2 以下であった。

7) Rab3 GAP の性状解析(2)

Rab3 GAP の精製標品をさらにショ糖密度勾配遠心法で分画したところ、活性のピークは分子量約 290kDa に認められ、活性のピークに一致して 130kDa と 150kDa の蛋白質が認められた。さらに、ショ糖密度勾配遠心法の活性分画を 0.6% CHAPS 存在下で MonoQ カラムを用いて分画したところ、活性のピークに一致して 130kDa と 150kDa の蛋白質が認められ、両者がヘテロダイマーを形成している可能性が示唆された。

【総括】

本研究では、ラット大脳シナプス可溶性画分より Rab3A を初めとする Rab3 サブファミリーに特異的に作用する Rab3 GAP を精製した。現在、Rab ファミリーには、酵母から哺乳動物に至るまで 30 種類以上のメンバーが見い出されており、各々が細胞内の特定な部位に局在してそこで小胞輸送を制御していることが明らかになっている。これまでに、酵母では、一つのメンバーに特異的な GAP が報告されていたが、本研究により、哺乳動物においても、各メンバーあるいは各サブファミリーに特異的な GAP が存在することが初めて証明された。Rab3 GAP の精製標品には 130kDa と 150kDa の 2 つの蛋白質が認められたが、本研究では、Rab3 GAP の活性本体である 130kDa の蛋白質の cDNA のクローニングを行い、その一次構造を決定した。130kDa のリコンビナント蛋白質は Rab3A に対して確かに GAP 活性を示したが、Rab3 GAP の精製標品に比べるとその分子活性が低いこと、および、ショ糖密度勾配遠心法において Rab3 GAP の精製標品が 290kDa の分子量を示したことより、Rab3 GAP は 130kDa と 150kDa の蛋白質のヘテロダイマーにより構成され、150kDa の蛋白質が 130kDa の蛋白質の活性を制御している可能性が示唆された。したがって、今後、150kDa の蛋白質についてもクローニングを行い、その機能を解析する必要があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

Rab3A 低分子量G蛋白質が、神経伝達物質の放出を制御していることは確定しているが、神経伝達物質の放出における Rab3A の活性化機構や作用機構はなお不明である。本申請者は、本研究において、プレシナプスにおける Rab3A の活性制御機構を明らかにする目的で、ラット大脳シナプス可溶性画分より Rab3A の GTPase 活性を促進して GTP 結合型の活性型から GDP 結合型の不活性型に変換する蛋白質 Rab3 GAP を世界で最初に精製することに成功した。さらに、その cDNA をクローニングして一次構造を決定するとともにその性状解析を行った。Rab3 GAP は Rab3A を含む Rab3 サブファミリーに特異的に作用し、しかもその作用には Rab3A の脂質による翻訳後修飾が必須であった。また、Rab3 GAP の精製標品には、今回一次構造を決定した活性本体である 130kDa の蛋白質以外に 150kDa の蛋白質が認められ、この 2 つの蛋白質はヘテロダイマーを構成している可能性が示唆された。これまでに、酵母では、Rab ファミリーの一つのメンバーに特異的な GAP が報告されていたが、哺乳動物では、各メンバーあるいは各サブファミリーに特異的な GAP は、本申請者が、本研究により、世界で最初に単離に成功した。

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。