



Title	Post-translational Processing of Rac p21s Is Important Both for Their Interaction with the GDP/GTP Exchange Proteins and for Their Activation of NADPH Oxidase
Author(s)	安藤, 賢
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40969
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら 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	安 藤 賢
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 2 8 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 5 月 7 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	Post-translational Processing of Rac p21s Is Important Both for Their Interaction with the GDP/GTP Exchange Proteins and for Their Activation of NADPH Oxidase (GDP/GTP 交換蛋白質との反応および NADPH oxidase の活性化における Rac p21 の翻訳後修飾の重要性)
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 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

マクロファージ等の貪食細胞は免疫複合体などの外界シグナルに反応して NADPH oxidase を活性化する。NADPH oxidase は細胞膜因子のチトクロム b_{558} (Cyt b) と細胞質因子の SOCI および $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ から構成されていることが知られている。 $p47^{phox}$ と $p67^{phox}$ は慢性肉芽腫症の原因遺伝子産物として見出されていたが、SOCI についてはその実体は不明であった。最近、私どもを含むいくつかのグループは SOCI が低分子量 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) *Rac* p21 であることを明らかにした。しかしながら、*Rac* p21 には *Rac1* p21 と *Rac2* p21 が存在しており、どちらかあるいは両者が SOCI であるかは明らかでなかった。

低分子量 G 蛋白質には不活性型である GDP 結合型と活性型である GTP 結合型が存在するが、この GDP 結合型から GTP 結合型への変換は GDP/GTP 交換蛋白質 (GEP) により制御されている。*Rac* p21 の GEP には促進性である *Smg* GDS と抑制性である *Rho* GDI が存在している。また、*Rac* p21 は他の低分子量 G 蛋白質と同様 C 末端にユニークな構造 Cys-A-A-Leu (A は脂肪族アミノ酸) を有しており、この C 末端構造が翻訳後修飾をうけることが明らかになっている。すなわち、Cys 残基のグラニルグラニル化、A-A-Leu 部分の切断、および露出した Cys 残基がカルボキシルメチル化される。私どもは翻訳後修飾が低分子量 G 蛋白質と GEP との反応に重要であることを明らかにしている。また、*Ras* p21 では翻訳後修飾がその transform 能などの作用に重要であることが明らかになっている。しかし、低分子量 G 蛋白質が標的蛋白質に作用し生理活性を発揮する際の翻訳後修飾の役割は明らかでなかった。

そこで、本研究では、*Rac* p21 の NADPH oxidase 活性化能を検討すると共に、GEP との反応および NADPH oxidase の活性化における *Rac* p21 の翻訳後修飾の役割について検討を行った。

【方法ならびに成績】

1) 材料の調製 *Smg* GDS は過剰発現させた大腸菌より、*Rho* GDI はウシ大脳細胞質画分より、 $p47^{phox}$ と $p67^{phox}$ はバキュロウイルス発現系で発現させた昆虫細胞 Sf9 細胞より精製した。*Rac* p21 (*Rac1* p21 および *Rac2* p21) は各 cDNA をトランスファーベクター pAcC13 に組み込んだ後、バキュロウイルス発現系でリコンビナント蛋白質を Sf9

細胞にそれぞれ過剰発現させた。Sf9 細胞をメバロン酸存在下で培養後、膜画分と可溶性画分からそれぞれ翻訳後修飾をうけた *Rac* p21 と、翻訳後修飾をうけていない *Rac* p21 を Mono Q 陰イオン交換カラムで精製した。 $[^3\text{H}]$ メバロン酸を用いた細胞標識実験と、geranylgeranyltransferase を用いた無細胞系標識実験により、翻訳後修飾をうけた *Rac* p21 のほとんどが膜画分に存在することが示された。

2) GEP との反応における *Rac* p21 の翻訳後修飾の役割 *Rac* p21 をあらかじめ $[^3\text{H}]\text{GDP}$ で標識し、*Smg* GDS あるいは *Rho* GDI 存在下での $[^3\text{H}]\text{GDP}$ 解離反応を測定した。さらに、両 GEP の存在下での *Rac* p21 への $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合反応を測定した。その結果、翻訳後修飾をうけた *Rac* p21 ではこれら二反応は、*Smg* GDS と *Rho* GDI の濃度依存的に促進あるいは抑制されたが、翻訳後修飾をうけていない *Rac* p21 の反応は影響されなかった。

3) *Rac* p21 による NADPH oxidase の活性化とその翻訳後修飾の役割 NADPH oxidase 活性は p47^{phox} と p67^{phox} および Cyt b として HL-60 細胞可溶性膜画分を *Rac* p21 と反応させた。その結果、翻訳後修飾をうけた *Rac* p21 では GTP γ S 結合型 *Rac* p21 は NADPH oxidase を活性化したが、GDP 結合型 *Rac* p21 はわずかに活性化するのみであった。また、GTP γ S 存在下で *Smg* GDS と *Rho* GDI は GDP 結合型 *Rac* p21 に作用して NADPH oxidase を促進あるいは抑制したが、GTP γ S 結合型 *Rac* p21 の活性化能には影響しなかった。次に、翻訳後修飾をうけた *Rac* p21 と翻訳後修飾をうけていない *Rac* p21 の NADPH oxidase 活性化能を比較した。GTP γ S 結合型 *Rac*1 p21 と *Rac*2 p21 の *K_a* 値は、翻訳後修飾をうけた *Rac* p21 はそれぞれ 3.0 nM も 3.5 nM で、翻訳後修飾をうけていない *Rac* p21 は 110 nM と 70 nM であった。すなわち、翻訳後修飾をうけていない *Rac* p21 による NADPH oxidase の活性化は、翻訳後修飾をうけた *Rac* p21 に比べわずかであった。

【総括】

本研究の結果、*Rac*1 p21 と *Rac*2 p21 の両者が SOCI であり、GTP 結合型が NADPH oxidase を活性化することが明らかになった。NADPH oxidase は *Rac* p21 以外に p47^{phox} と p67^{phox} および Cyt b で活性化することから、*Rac* p21 の標的蛋白質はこのいずれかと考えられるが、本研究では特定できていない。さらに、GEP が *Rac* p21 に作用する際と、*Rac* p21 が標的蛋白質に作用して NADPH oxidase を活性化する際、*Rac* p21 の翻訳後修飾が重要であることが明らかになった。本研究報告と同時期に *Rac*1 p21 が Swiss3T3 細胞にラップリングを起こすことが報告され、私どもも KB 細胞で確認している。上記の三因子は貪食細胞以外にはないことから細胞によって *Rac* p21 の標的蛋白質が異なる可能性がある。この標的蛋白質の問題は翻訳後修飾をうけた *Rac* p21 での解析で解明されることが考えられる。また、低分子量 G 蛋白質は翻訳後修飾をうけた後に生理活性を持つことが示され、修飾をうけた標品での解析により低分子量 G 蛋白質の機能、活性化機構および作用機構の全貌が分子レベルで解明されることが考えている。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により無細胞系で NADPH oxidase 活性を測定するアッセイを用いて、低分子量 GTP 結合蛋白質 *Rac*1 と *Rac*2 の両者が NADPH oxidase を活性化することを明らかにした。また、*Rac* の活性制御蛋白質である *Smg* GDS と *Rho* GDI が、*Rac* を介して NADPH oxidase を制御していることを明らかにした。さらに *Rac* の C 末端領域はゲラニルゲラニル基およびメチル基による翻訳後修飾を受けることが知られているが、この翻訳後修飾が *Rac* による NADPH oxidase の活性化に必要であることを明らかにした。

Rac の生理機能を特定し、*Rac* がその生理機能を示す際、その翻訳後修飾が必要であることを明らかにできたことは、今後のこの分野の研究に極めて重要な意義を持つものと考えられる。今後の発展性や生命科学への貢献度から鑑み、学位授与に十分値するものと認める。