

Title	The Geranylgeranyl Moiety but Not the Methyl Moiety of the smg25A/rab3A Protein Is Essential for the Interactions with Membrane and Its Inhibitory GDP/GTP Exchange Protein.
Author(s)	武者,孝志
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41036
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

[ 19 ]

氏 名 **武** 者 孝 志

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学位記番号第13295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 The Geranylgeranyl Moiety but Not the Methyl Moiety of the

smg25A/rab3A Protein Is Essential for the Interactions with Membrane and Its Inhibitory GDP/GTP Exchange Protein.

(Smg25A/Rab3A p25 と細胞膜および GDP/GTP 交換反応抑制蛋

白質との相互作用におけるゲラニルゲラニル基の重要性)

(主査)

論 文 審 査 委 員 教 授 高井 義美

(副査)

教 授 谷口 直之 授 米田 悦啓

# 論文内容の要旨

# [目的]

Smg25A/Rab3A p25(以下 Rab 3A)は Rab ファミリーに属する低分子量 GTP 結合蛋白質(G 蛋白質)である。 Rab 3A は神経細胞シナプス小胞に多く存在しており,近年,神経伝達物質の放出機構において重要な機能を果たしていることが明らかになりつつある。 私共は,この Rab 3A がその C 末端に Cys を 2 個有しており,翻訳後修飾を受けてこの 2 個の Cys 残基にゲラニルゲラニル基転移酵素によりゲラニルザラニル基が結合し,さらに C 末端側の Cys 残基がメチル化されることを明らかにしている。 Rab 3A 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。 私共はこの Rab 3A の GDP/GTP 交換反応を抑制する蛋白質 Rab GDI を見い出し,この蛋白質による Rab 3A の活性制御には翻訳後修飾が必須であることを明らかにしている。 ECS が翻訳後修飾の必要性に関する知見は,翻訳後修飾を受けていない大腸菌由来のリコンビナント ECS ECS

## 「方法ならびに成績〕

# 1) Rab 3A と Rab GDI の調製

リコンビナント Rab3A は,Rab3A を過剰発現させた大腸菌より精製した。Rab3A-GG は,リコンビナント Rab3Aをウシ大脳可溶性画分から部分精製したゲラニルゲラニル基転移酵素とゲラニルゲラニル基の供与体である [ $^3H$ ]-ゲラニルゲラニルピロリン酸を反応させて作製した。また Rab3A-GG-Me はウシ大脳膜画分から精製した。Rab GDI はウシ大脳可溶性画分より精製した標品を用いた。

#### 2) Rab GDI 活性における Rab 3A の翻訳後修飾の役割

3種の Rab 3A において、[ $^{35}$ S]  $GTP_{\gamma}S$  結合反応の抑制を指標に Rab GDI 活性を比較した。その結果、Rab GDI はリコンビナント Rab 3A-GG およぴ Rab 3A-GG-Me に対して、ばぼ同等の GDI 活性を示したが、リコンビナント Rab 3A には GDI 活性を示さなかった。したがって Rab 3A の翻訳後修飾のうち、Rab GDI の GDP/GTP 交換反応 抑制活性の発現に重要であるのはゲラニルゲラニル基であり、メチル基ではないことが明らかになった。またゲラニルゲラニル化された 2種の Rab 3A は、[ $^{35}$ S]  $GTP_{\gamma}S$  結合活性が時間依存的に低下することから、ゲラニルゲラニル 基が何らかの機序でヌクレオチド結合能に影響を及ぼしている可能性が考えられる。なおこの現象は Rab GDI を共存させることにより抑制された。この現象はゲラニルゲラニル基を有する Rab 3A と Rab GDI との複合体形成を示すものと考えられる。しかしメチル化の有無による差異は認められないことから、この際にも必要であるのはゲラニルゲラニル基でありメチル基ではないことが明らかになった。

# 3) Rab 3A と細胞膜との結合における Rab 3A の翻訳後修飾の役割

ラット大脳からシナプス小胞膜をショ糖密度勾配遠心法で精製し、 $[^{35}S]$ GTP $_YS$ であらかじめラベルした 3 種の Rab 3A とインキュベート後,遠心法で可溶性画分と膜結合性画分を分離し,それぞれに回収される Rab 3A を定量した。その結果,リコンビナント Rab 3A-GG および Rab 3A-GG-Me は膜画分に回収され,シナプス小胞膜と結合していることが明らかになった。一方,リコンビナント Rab 3A は可溶性画分に回収され,膜結合能を有さないことが判明した。したがって Rab 3A とシナプス小胞膜との結合にはゲラニルゲラニル基は必須であるが,メチル基は必要でないことが明らかになった。

# 4) Rab GDI による Rab 3A の細胞膜結合制御における役割

あらかじめ [³H]GDP 型で標識したリコンビナント Rab 3A-GG および Rab 3A-GG-Me を Rab GDI の共存あるいは非共存下でシナプス小胞膜とインキュベート後,超遠心で分離した。その結果 Rab GDI 非存在下ではいずれの Rab 3A も膜画分に回収されたが,Rab GDI を共存させるといずれの Rab 3A も可溶性画分に移動した。また [³H] GDP 型で標識したリコンビナント Rab 3A-GG およぴ Rab 3A-GG-Me をあらかじめシナプス小胞膜とインキュベートし,膜に結合させた後,Rab GDI を添加しインキュベートを行うと,いずれの Rab 3A も膜から解離し可溶性画分に移動した。以上より,Rab GDI による Rab 3A のシナプス小胞膜への結合抑制と,膜からの解離促進作用においてもゲラニルゲラニル化は必須であるがメチル化は必要でないことが明らかになった。

# [総括]

本研究の結果から、Rab 3A の翻訳後修飾のうちゲラニルゲラニル化のみが Rab GDI の GDP/GTP 交換反応抑制活性や Rab 3A のシナプス小胞膜との結合に必要であり、メチル化は必ずしも必要でないことが明らかとなった。また、Rab GDI は、Rab 3A の細胞膜への結合を制御する活性が示すが、この活性にも重要であるのは Rab 3A のゲラニルゲラニル基であり、メチル基ではないことが判明した。本研究で得られた結果は、すべて Rab GDI と Rab 3A との複合体形成にはゲラニルゲラニル基の存在が必要十分であることを示唆するものである。現時点で Rab 3A におけるメチル基の意義は明らかではなく、今後の検討課題として興味探い。

近年,Rab~3A の標的蛋白質が同定され,神経伝達物質放出機構におけるRab~3A を中心とした巧妙な機構が解明されつつある。このような状況下で,本研究で得られたRab3A 蛋白質の活性制御における翻訳後修飾に関する知見は今後ますます重要性を増すと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究にて神経伝達物質の放出機構において重要な役割を担っている低分子量 GTP 結合蛋白質 Rab~3A の翻訳後修飾である C 末端 Cys 残基におけるゲラニルゲラニル化とメチル化の役割を検討した。その結果、 C 末端の 2 つの Cys 残基のゲラニルゲラニル化が Rab3A E GDP/GTP 交換反応抑制蛋白質 Rab GDI や細胞膜との

相互作用に必要十分であり、メチル化は必ずしも必要でないことを明らかにした。

Rab 3Aの活性化機構や作用機構における翻訳後修飾の役割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を鑑み、学位授与に十分値するものと認める。