



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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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 武 者 孝 志

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 3 2 9 5 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)

論 文 審 査 委 員 (主査)
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ゲラニル基が結合し、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。ところ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 Rab 3A とゲラニルゲラニル化およびメチル化も受けているウシ大脳膜画分由来の native form の Rab 3A との比較により得られたものである。したがってゲラニルゲラニル基およびメチル基それぞれの重要性については明らかにされていない。そこで本研究は、未修飾のリコンビナント Rab 3A およびリコンビナント Rab 3A-GG (リコンビナント Rab 3A をゲラニルゲラニル化したもの) の Rab GDI に対する感受性および細胞膜に対する結合能を、ゲラニルゲラニル化およびメチル化を受けている native form (Rab 3A-GG-Me) と比較検討し、ゲラニルゲラニル基およびメチル基それぞれの役割を明らかにすることを目的とした。

[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, [³⁵S] GTPγS 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 および *Rab* 3A-GG-Me に対して, ほぼ同等の 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, [³⁵S]GTPγS 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, [³⁵S]GTPγS 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 および *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深い。

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 *Rab* 3A 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 *Rab* 3A と 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。