

Title	Isolation and Characterization of a GDP/GTP Exchange Protein Specific for the Rab3 Subfamily Small G Proteins
Author(s)	和田, 学
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/43242
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	和田 学 ^{まなぶ}
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16451 号
学位授与年月日	平成13年6月5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	Isolation and Characterization of a GDP/GTP Exchange Protein Specific for the Rab3 Subfamily Small G Proteins (Rab3 サブファミリー特異的 GDP/GTP 交換反応促進蛋白質の単離と性状解析)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 倉智 嘉久 教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

【目的】

Rab ファミリー低分子量G蛋白質は、30以上のメンバーからなり、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスなどの細胞内小胞輸送を制御している。各メンバーはそのC末端に特徴的な脂質修飾を受け、不活性型の GDP 結合型と活性型の GTP 結合型の間と、細胞質画分と膜画分の間をサイクルしている。これらのサイクルは各 Rab ファミリーメンバーの機能に必須であり、GDP 結合型から GTP 結合型への変換は2種類の GDP/GTP 交換反応制御蛋白質によって制御されている。ひとつは交換反応を促進する GDP/GTP 交換反応促進蛋白質 (GEP) であり、他方は交換反応を抑制する GDP 解離抑制蛋白質 (GDI) である。Rab GDI はすでに単離され、詳細にその性状が解析されてきた。Rab GDI は Rab ファミリーのすべてのメンバーに作用し、脂質修飾を受けた GDP 結合型と特異的に複合体を形成して、GTP 結合型への変換と膜への移行を抑制する。一方、Rab GEP については、複数の Rab サブファミリーに作用する Mss4 が報告されているだけであり、各メンバーあるいは各サブファミリーに特異的な GEP は単離されていなかった。

Rab3 サブファミリーは Rab3A、-3B、-3C、-3D の4つのメンバーからなり、Rab3A、-3C は Ca^{2+} 依存性のエキソサイトーシス、特に神経伝達物質の放出を制御している。本研究では、Rab3 サブファミリーに特異的な GEP の単離と性状解析を試みた。

【方法ならびに成績】

1) Rab3 GEP の精製

ラット脳の可溶性シナプス画分より、6段階のカラムクロマトグラフィー (Q-Sepharose、phenyl-Sepharose、hydroxyapatite、MonoQ、Superdex200、HPLC hydroxyapatite) によって精製した。GEP 活性は脂質修飾された Rab3A からの $[^3H]$ GDP の解離を指標として測定した。Superdex200ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて、GEP 活性は単一のピークを示し、SDS/PAGE での分子量約200kDa のバンドの出現パターンと一致した。HPLC hydroxyapatite カラムでは、GEP 活性は二つのピーク (Rab3 GEP I、-II と命名) を示し、ともに SDS/PAGE での分子量約200kDa のバンドの出現パターンと一致した。

2) Rab3 GEP の性状解析

精製した Rab3 GEP II の性状をリコンビナントの Mss4 と比較した。まず、脂質修飾された Rab3A、-3B、-3C、-

3D、-2、-5A、-10、-11を大量発現させた Sf9 細胞から精製し、基質特異性を検討した。Rab3 GEP II は Rab3A、-3C に作用し、Rab3D に弱い活性を示したが、Rab3B、-2、-5A、-10、-11には作用しなかった。一方、Mss4 は Rab3A、-3C、-3D、-10、-11に対して GEP 活性を示した。つぎに、脂質修飾を受けていない Rab3A を大量発現させた大腸菌より精製し、脂質修飾の影響を検討した。Rab3 GEP II は脂質修飾を受けた Rab3A へのみ活性を示したが、Mss4 は脂質修飾の有無に関わらず活性を示した。さらに、Rab GDI と複合体を形成している Rab3A に対する作用を検討した。Rab3 GEP II は Mss4 とともに、Rab GDI 存在下では GEP 活性を示さなかった。Rab3 GEP I の性状は、上記の Rab3 GEP II の性状と同様であった。

3) Rab3 GEP cDNA のクローニングとそのヌクレオチド配列ならびにアミノ酸配列の決定

800匹のラット脳から、上記のクロマトグラフィーより分子量約200kDa の Rab3 GEP I と-II のバンドを精製し、ペプチドマップを作製した結果、両蛋白質のペプチドマップはほぼ完全に一致した。つぎに、Rab3 GEP II の部分アミノ酸配列を決定し、その情報に基づいて cDNA のクローニングを行い、ヌクレオチド配列と、さらにその配列に基づいてアミノ酸配列を決定した。Rab3 GEP は1,602アミノ酸からなり、計算上の分子量は177,982であり、既知の蛋白質との相同性は認められなかった。クローニング中に複数のスプライシングアイソフォームを単離したことより、Rab3 GEP I、-II はスプライシングアイソフォームの関係にあると考えられる。

4) リコンビナントの Rab3 GEP の性状解析

リコンビナントの Rab3 GEP を COS7 細胞に強制発現させ、MonoQ カラムクロマトグラフィーで精製した。リコンビナントの Rab3 GEP は、上記の Rab3 GEP I、-II と同様の性状を示した。

5) Rab3 GEP の発現組織

ノザンおよびウエスタンブロット解析により、Rab3 GEP は臓器普遍的に発現しており、特に脳において強く発現していた。

【総括】

私は、本研究において、脂質修飾された Rab3 サブファミリーに特異的な Rab3 GEP の単離に成功し、その性状解析を行った。Rab ファミリーの各メンバーあるいはサブファミリーに特異的な GEP はそれまでに報告されておらず、本研究の結果から、30以上のメンバーから構成される Rab ファミリーには、それぞれのメンバーあるいはサブファミリーに特異的な GEP が存在し、細胞内小胞輸送での各メンバー固有の機能を調節していることが考えられる。また、Rab3 GEP が Rab GDI 存在化で活性を示さなかったことは、Rab3 と Rab GDI を解離させる別の因子の存在が示唆される。最近、私共は、Rab3 GEP ノックアウトマウスを作製・解析し、Rab3 GEP の欠失によって、神経終末のシナプス小胞が著しく減少し、神経伝達物質の放出が障害されることを明らかにしている。一方、Rab3 GEP が作用する Rab3A、-3C は、シナプス小胞の輸送を制御しているが、神経伝達物質の放出に必須でないことが明らかになっている。したがって、Rab3 GEP は、Rab3A、-3C のみならず Rab3D あるいは何らかの機構を介してシナプス小胞の形成と輸送を制御し、神経伝達物質の放出に必須の役割を果たしていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Rab3 サブファミリー低分子量G蛋白質は、神経伝達物質放出を制御しているが、その活性調節機構は十分に明らかでなかった。本申請者は、本研究において、Rab3 サブファミリーの GDP/GTP 交換反応促進因子 (Rab3 GEP) を単離精製し、Rab3 GEP が Rab3 サブファミリーを特異的に活性化することを明らかにしている。さらに Rab3 GEP cDNA のクローニングを行い、Rab3 GEP は既知の蛋白質と相同性を持たない新規蛋白質であることを明らかにしている。また、Rab3 GEP は脂質修飾された Rab3 サブファミリーに対してのみ活性を示し、Rab GDI と複合体を形成した Rab3A には作用しないことを見出ししている。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、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。