



Title	Isolation and Characterization of a GDP/GTP Exchange Protein Specific for the Rab3 Subfamily Small G Proteins
Author(s)	和田, 學
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43242
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	和田 學
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Ca²⁺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^{[3]H}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、-

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に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 GEPI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により分子量約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プロット解析により、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と考えられる。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。