

学 位 論 文 題 名

低分子量 GTP 結合蛋白質 Gp/G25K の分子生物学的研究

学位論文内容の要旨

Gp (G25K) は哺乳類の様々な組織において、広く認められる低分子量GTP結合蛋白質である。精製ヒトGp/G25K蛋白質から得られたペプチド断片のアミノ酸配列をもとに得られたオリゴヌクレオチドプローブを用いてヒト胎盤cDNAライブラリーより低分子量GTP結合蛋白質 Gp/G25K のcDNA クローンを単離した。cDNAにより推定されるアミノ酸配列は様々な種類のras関連低分子量GTP結合蛋白質と構造上の類似性を示した。特にヒトrho, rac とはそれぞれ50%, 70% の高い相同性を示し、Gp/G25Kは ras関連低分子量GTP結合蛋白質のなかのrhoサブファミリーに属することが判明した。しかし、最も高い相同性 (80%) はイースト (*Saccharomyces cerevisiae*) セルサイクル蛋白質、CDC42Scとの間に認められた。Gp/G25K cDNA を *S. cerevisiae* の温度感受性致死性cdc42-1 欠損変異株に導入したところ、cdc42の機能を代償した。これらの結果は、Gp/G25Kは イーストCDC42 のヒトに

おけるホモログであるということを示唆すものであり、この低分子量GTP結合蛋白質を改めてCDC42Hs (*Homo sapiens*) と命名した。

CDC42Hs (Gp/G25K)のシグナル伝達経路を解明するため、*S. cerevisiae*においてCDC42Scの下流で機能し、さらにrhoサブファミリーに働くことが示されている数種のGTPase 活性促進蛋白質(GTPase-activating proteins; rho-GAPs) とアミノ酸配列上類似性の認められる *S.cerevisiae* の発芽部位形成制御蛋白質であるBem2 およびBem3 とCDC42Hsとの相互作用を調べた。Bem2, Bem3 の rho-GAPs 相同領域 と glutathione S-transferase (GST) 蛋白質との融合蛋白質 (GST-Bem2, GST-Bem3) を作製し反応性を試験したところ、GST-Bem3 は正常型CDC42Hs (CDC42Hs^{Gly12}) のGTPase活性を促進するが、GTPase 活性欠損変異型 CDC42Hs (CDC42Hs^{Val12}) に対してはGTPase活性を促進しないということが判明した。一方 GST-Bem2 については、どちらの型の CDC42Hs の GTPase 活性も促進しなかった。数種のBem3 の欠失ミュータント、およびBem2/Bem3 キメラ蛋白質を作製しCDC42Hs の GTPase 活性促進作用に最小限必要な部位の特定を行ったところ、rho-GAP相同領域中の3つの副相同領域 (homology box) とそのC末端側領域のとり三次元構造が完全なGTPase 活性促進作用に必要であることが示された。また、その中

でも N 末端側の 2 つのhomology boxがGTPase 活性促進作用発現に重要であり、C 末端側のhomology boxがCDC42Hsへの結合と部分的なGTPase活性促進作用に必要であると示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菅 野 富 夫

副 査 教 授 中 里 幸 和

副 査 教 授 斉 藤 昌 之

副 査 助 教 授 稲 葉 睦 (東京大学農学部)

学 位 論 文 題 名

低分子量 GTP 結合蛋白質 G_p/G25K の分子生物学的研究

グアニンヌクレオチド[guanosine triphosphate (GTP) と guanosine diphosphate (GDP)]と特異的に結合する蛋白質をGTP結合蛋白質 (G 蛋白) と呼ぶ。G 蛋白はGTPの結合と加水分解をくりかえすことによって、その機能を現す。真核生物の細胞において、低分子量 G 蛋白は、情報伝達G 蛋白と呼ばれ、注目を集めてきている。申請者、新庄勝浩氏は、精製ヒト低分子量G 蛋白G_p/G25Kから得られたペプチドのアミノ酸配列をもとに得られたオリゴヌクレオチドプローブを用いてヒト胎盤 complementary deoxyribonucleic acid(cDNA)ライブラリーよりG_p/G25KのcDNAクローンを単離した。cDNAより推定されるアミノ酸配列は様々な種類のras関連低分子量G 蛋白と構造上の類似性を示した。特にヒトrho,racとはそれぞれ50%、70%の高い相同性を示し、G_p/G25Kはras関連低分子量G 蛋白ファミリーのなかのrhoサブファミリーに属することが判明した。しかし、最も高い相同性(80%)はイースト(*Saccharomyces cerevisiae*)セルサイクル蛋白質、CDC42Scとの間に認められた。G/G25K DNAをイーストに導入したところ、温度感受性致死性CDC42-1欠損変異を相補した。これらの結果は、G_p/G25KはCDC42のヒトにおけるホモログであるということを示唆するものであり、この低分子量G 蛋白を改めてCDC42Hs (*Homo sapiens*)と命名した。

次いでCDC42Hs (G_p/G25K) のシグナル伝達経路を解明するため、イーストにおいてCDC42Scの下流で機能し、rhoサブファミリーに働くことが示されている数種のGTPase活性促進蛋白質 (GTPase-activating proteins;rho-GAPs)とアミノ酸配列上類似性のあるイーストの発芽部位形成制御蛋白質、Bem2およびBem3とCDC42Hsとの相互作用を調べた。Bem2, Bem3のrho-GAPs相同領域とglutathione S-transferase(GST)蛋白質との融合蛋白質(GST-Bem2, GST-Bem3)を作製し反応性を試験したところ、GST-Bem3は正常型CDC42Hs (CDC42Hs^{Gly12})のGTPase活性を促進するが、GTPase活性欠損変異型CDC42Hs (CDC42Hs^{Val12})に対してはGTPase活性を促進しないということが判明した。一方GST-Bem2については、どちらの型のCDC42HsのGTPase活性も促進しなかった。数種のBem3の欠失ミュータントおよびBem2, Bem3キメラ蛋白質を作製しCDC42HsのGTPase活性促進に最小限必要な部位の特定を行ったところ、rho-GAP相同領域中の3つの副相同領域(homology box)とそのC末端領域が完全なGTPase活性促進作用に必要であることが示された。また、その中でもN末端側の2つのhomology boxがGTPase活性促進作用発現に重要であり、C末端側のhomology boxがCDC42Hsへの結合と部分的なGTPase活性促進作用に必要であることが示唆された。CDC42Hs (G_p/G25K) は、イーストにおいて、発芽形成

の調節に関与しているCDC42の機能を代償するという結果から、このG蛋白は哺乳類の細胞の形態形成、細胞分裂において重要な役割を演じているものと予測される。

審査担当者一同は、新庄勝浩氏のこの研究は、細胞生物学に基礎を置く獣医学の発展に寄与するところが大きく、博士（獣医学）を受ける資格があると判定した。