

刺激依存的に細胞膜に移行するGタンパク共役系調節因子群のプロテオーム解析

●齊藤 修¹⁾ ◆小田桐 恵¹⁾ ◆久保 義弘²⁾

1) 財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所

2) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

〈研究の目的と進め方〉

Gタンパク共役系の調節因子であるRGSファミリーは、G α のGAPとしての能力をもち、Gタンパク共役反応の阻害や加速といった調節を行う。一方、最近RGS4やRGS8が、非刺激時には細胞質や核に分布して反応相手の細胞膜上のG α とは離れていること、しかし活性化型のG α を共発現させてGタンパク刺激を行うと、それらは細胞膜に移動して行くことが示された。このことから、Gタンパクの応答調節系は、入力依存的なまた部位特異的なシステムであって、入力があるとその部位のGタンパクの近傍に種々のGタンパク調節因子が移動して機能する機構であると想定される。そこで本研究では、細胞膜移行を指標に、様々なGタンパク制御因子群を見つけ出し、Gタンパク制御システムを明らかにしていくことを目的にした。

〈研究開始時の当初計画〉

本研究では、Gタンパク刺激後に細胞膜に集積してくるピュータティブなGタンパク制御因子群を見出すため、活性化型G α を発現させた細胞と対照の細胞の細胞膜画分のプロテオームマップを比較して、特異的スポットを検出する。

〈研究期間の成果〉

- 1) Gタンパク刺激後に細胞膜に集積してくるピュータティブなGタンパク制御因子群を見つけ出して行くため、まず培養細胞の細胞膜の分画法を検討し、次いで、二次元電気泳動の泳動条件を詳しく検討した。しかし、タンパクスポットの量の変動の再現性を得るのに困難を極め、結局この方法による変動タンパクの同定は一時保留した。
- 2) そこで、次に活性化依存的に細胞膜上のG α に結合してくる分子群を見出す観点で、まず脳の抽出液から非変性状態でG α を含む複合体を、免疫沈降する手法を試みた。まず脳に豊富に存在するG α_o に注目して、抗G α_o 抗体を用いて種々の条件検討を行った。そして、G α_o を効率よく免疫沈降できる条件が分かり、その条件で分子量30~35kDaのタンパクが挙動を共にすることが判明した。
- 3) 細胞膜移行するGタンパク制御因子を検索するもう一つのアプローチは、既に膜移行することが知られている分子の膜移行の機構・性質を明らかにして、同様の機構を使う因子を見つけ出して行くことである。そこで、活性化Gタンパクの共発現で核から細胞膜に移動することが既に明らかになっているRGS8の組み換えタンパクを作成して、その細胞膜結合性を詳しく検討した。そして、まずGST融合タンパクとして調製した可溶性のRGS8タンパクが、実際に小脳の膜画分に結合することが超遠心法で明らかになった。その上、Gタンパク活性化条件では、さらにその膜結合が増強することが明らかになった。そこで、RGS8タンパクが小脳膜画分中の脂質やタンパクと結合することが考えられたが、次にR

GS8がどのような脂質と親和性があるのか、各種の脂質をスポットしたメンブレンでprotein-lipid overlay assayを行った。そして、RGS8が、LPAとイノシトールリン脂質に、さらに弱く主要な細胞膜リン脂質のホスファチジルセリンに結合することが明らかになった。また、グルタチオンビーズを利用した共沈実験によって、小脳膜画分のどのタンパク成分がRGS8に結合しうるか、またそれはGタンパク活性化で変化するかどうか検討した。すると40kDaのタンパクが、Gタンパク活性化条件で有意に結合が増加し、一方、50kDaと75kDaのタンパクがGタンパクの活性非依存的に結合することが判明した。40kDaのタンパクは、G α と考えられた。このように活性依存的な膜移行性を示すRGS8タンパクの、特徴的な性質の幾つかが明らかになってきた。今後、さらにこの膜移行タンパクの特徴を明らかにして、その責任配列などを解明していけば、その配列から同様な新規分子群を見つけ出していけると考えられる。

〈国内外での成果の位置づけ〉

細胞膜移行を指標に、Gタンパク制御因子群を網羅的に見つけ出していこうとする試みは、ほとんど報告がなく、内外で随一であった。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

細胞分画による膜画分の調製は、比較的容易であった。しかし、2次元電気泳動上の蛋白質スポットの量の変動を再現性良く同定することは、極めて困難であった。おそらく再現性良く高効率で膜成分を可溶化して、それを等電点ゲルに展開するのが非常に難しいのだと思われた。

〈今後の課題〉

G α 複合体の解析、RGS8結合タンパクの解析によって、幾つかの候補タンパクが見つかった。これらの系を如何に効率化して、解析を網羅的に展開できるかが、今後の課題である。