

脳 GTP 結合蛋白質の異種 γ サブユニットに対する カルボキシメチル基転移酵素に関する研究

橋本英樹 相馬 仁

札幌医科大学医学部生化学第1講座 (主任 秋野豊明 教授)

Studies on Characterization of Protein carboxyl Methyltransferase for Different γ -subunits of Brain GTP-binding Protein.

Hideki HASHIMOTO and Hitoshi SOHMA

First Department of Biochemistry,

Sapporo Medical University School of Medicine

(Chief : Prof. T. AKINO)

ABSTRACT The heterotrimeric GTP-binding proteins (G-proteins) consist of the α , β and γ subunits, which exist physiologically in the two functional units of α and $\beta\gamma$. Recent observations have revealed that the COOH-terminal cysteine residue of γ -subunit (G γ) is posttranslationally isoprenylated with thioether-linkage and carboxyl methylated. We have previously demonstrated that the $\beta\gamma$ -subunits of bovine brain G-protein (Gi/o) could be separated into two subspecies, $\beta\gamma$ -I and $\beta\gamma$ -II. Both of them possess identical β -subunits but structurally different γ -subunits, γ -I and γ -II.

In the present study, we investigated the carboxyl methylation of G γ in rat brain microsome fraction, i. e., we investigated the final step of the posttranslational modification of G γ . G γ -carboxyl methyltransferase was characterized and its physiological significance was studied using $\beta\gamma$ -I and $\beta\gamma$ -II as substrates. Both γ -I and γ -II were carboxyl methylated during incubation with rat brain microsome fraction and S-adenosyl- ^3H -L-methionine. The maximum amount of the ^3H methyl incorporated into both G γ s was about 0.1 mol/mol. A kinetic study revealed that the Km for $\beta\gamma$ -I was five times that of $\beta\gamma$ -II, while the Vmax for $\beta\gamma$ -II was twice that of $\beta\gamma$ -I. This fact indicates that $\beta\gamma$ -II is a more appropriate substrate than $\beta\gamma$ -I for G γ -carboxyl methyltransferase. Radioactive G γ was detected only in the pellet fraction after centrifugation of the reaction mixture, although the G γ band was found in both supernatant and pellet fractions under silver staining. The carboxyl methylation of G γ was not affected by the presence of different amounts of α -subunit. The carboxyl methyltransferase was solubilized from rat brain microsomes by the treatment with various detergents; enzyme activity was found only in the supernatant solubilized with Tween 20 among the detergents examined.

(Received January 11, 1994 and accepted January 24, 1994)

Key words: GTP-binding protein, Posttranslational modification, Methylation

Abbreviations

MOPS	: 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid	SAM	: S-adenosyl-L-methionine
TCA	: trichloroacetic acid	SAH	: S-adenosyl-L-homocysteine
CHAPS	: 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate	DTT	: dithiothreitol
TFA	: trifluoroacetic acid	SDS-PAGE	: sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
		PMSF	: phenylmethanesulfonyl fluoride

1 緒 言

三量体 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) は受容体刺激を介する情報伝達系のトランスデューサーで、各種の酵素活性、イオンチャンネルを制御している¹⁻³⁾。G 蛋白質は α , β , γ サブユニット (分子量: $G\alpha$, 39-52 kDa; $G\beta$, 35/36 kDa; $G\gamma$, 約 7 kDa) 構造を持つ。生理的条件下で β , γ サブユニットは解離せず、 $G\alpha$ 及び $G\beta\gamma$ の形で存在している。受容体刺激に伴い、 α サブユニットに結合していた GDP は GTP と交換される。この $G\alpha$ -GTP は $G\beta\gamma$ から解離し、効果器を活性化する。 $G\alpha$ は GTPase 活性を持つので、次いで GTP が加水分解されると、 $G\alpha$ は $G\beta\gamma$ と再び結合し効果器は静止状態に戻る¹⁻³⁾。

$G\alpha$ は異種性が高く、GTP 結合部位の他受容体結合部位、効果器との相互作用部位を有し、どの受容体がどの効果器へのシグナル伝達を行なうのか決める、いわば G 蛋白質機能の中心的役割を担っている。一方、 $G\beta\gamma$ は $G\alpha$ との相互作用及び膜との結合による $G\alpha$ の機能調節作用の他、 $G\beta\gamma$ による直接のシグナル伝達に関与する例も報告されている^{4,5)}。 $G\beta$ はそれをコードする DNA から 4 種類あることが知られているが、これらは一次構造上 90% 以上の相同性を持ち、機能的な差はほとんどないと考えられている⁶⁻⁹⁾。 $G\gamma$ をコードする cDNA は現在まで 7 種類が報告されている¹⁰⁻¹⁴⁾ が、蛋白質レベルでは、筆者ら^{15,16)} が初めて γ -I, γ -II の存在及びその一次構造の違いを示した。異なる一次構造をもつ $G\gamma$ の役割は不明であるが、 $G\gamma$ の C 末端には共通の一次構造があることが判明している¹⁰⁻¹⁴⁾。すなわち、C 末端から 4 残基目にシステインが存在する。C 末端に CXXX (C; システイン, X; 任意のアミノ酸) 構造を持つ蛋白質は、翻訳後そのシステイン残基において、(1) イソプレニル基のチオエーテル結合、(2) C 末端三残基の切断、(3) 新たに C 末端となったシステイン残基カルボキシル基のメチルエステル化という一連の修飾を受けることが知られている¹⁷⁾。このような構造を持つ蛋白質には、 $G\gamma$ の他に視細胞トランスデューシン (Tr), ras 蛋白質などの低分子量単量体 G 蛋白質、酵母成長因子などがある¹⁸⁻²⁰⁾。

このイソプレニル基及びメチル基による翻訳後修飾の生理的役割については、これら脂質性分子の構造修飾による膜との相互作用が考えられており、G 蛋白質機能調節における役割が注目されているが、その詳細は現在まだ明らかではない。最近イソプレニル転移酵素がラット脳細胞質から精製され、その性状が解明さ

れた²¹⁾。しかし、これら $G\gamma$ を基質とするカルボキシメチル基転移酵素 (以下 $G\gamma$ メチル基転移酵素) についての報告は数編あるのみである^{15,14-24)}。

筆者ら^{15,16,25)} は、最近牛脳に同一の $G\beta$ と複合体を形成する異なる $G\gamma$ (γ -I, γ -II) の存在を示し、それらの一次構造および生化学的性質の違いを明らかにした^{15,16,25)}。本研究では、この γ サブユニットの異なる二種の $G\beta\gamma$ 、すなわち $\beta\gamma$ -I, $\beta\gamma$ -II を基質として用い、翻訳後修飾の最終段階である $G\gamma$ メチル基転移酵素の性状について検討した。その結果、ラット脳ミクロソームの $G\gamma$ メチル基転移酵素は $\beta\gamma$ -I よりも $\beta\gamma$ -II を基質として、より利用することが明らかとなり、異種 $G\beta\gamma$ の役割について新たな知見が得られた。次いで新たにメチル化された $G\beta\gamma$ は、膜に移行したことを示唆する事実を見出した。また、Tween 20 を用いて、脳ミクロソームから $G\gamma$ メチル基転移酵素を、その活性を失うことなしに可溶化し得たことも合わせて報告する。

2 実験方法

2.1 G 蛋白質 (Gi/o) の調製及び $\beta\gamma$ サブユニットの分離

新鮮な牛脳は札幌畜産公社より購入し、 -80°C で保存した。以下の操作は、断りがなにかぎり 4°C で行なった。

G 蛋白質 (Gi/o) の調製は、Milligan *et al.*²⁶⁾ により改変された Sternweis and Robishaw の方法²⁷⁾ を更に一部改変して行なった。Gi/o の調節及びその $\beta\gamma$ サブユニットの分離の操作手順を Fig. 1 に要約する。冷凍脳 (600 g) をハンマーで碎き 2.5 l の buffer A (10% sucrose, 20 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soybean trypsin inhibitor, 0.1 mM

Preparation of bovine brain Gi/o and separation of $\beta\gamma$ -subunits

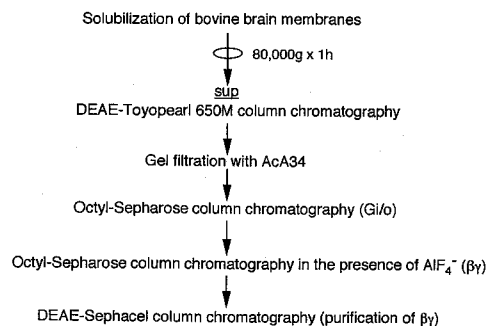


Fig. 1 Purification step of $\beta\gamma$ -subunits of G-protein (Gi/o) from bovine brain.

PMSF) とともにミキサーでホモジェナイズした (20 秒, 3 回). 二重のガーゼで濾過後, 600 xg, 10 分間遠心し, 上清をさらに 12,000 xg, 40 分間遠心して沈殿を膜画分とした. 膜の可溶化は, 次のように行なった. 膜画分体積の 50% の sucrose を含まない buffer A を加えた後, コール酸パウダーを最終濃度 1.5% となるように加えて溶かし, さらに攪拌しながら 1 時間インキュベートした. 次に 80,000 xg, 1 時間の超遠心を行ない, buffer B (1% コール酸を含む buffer A) で平衡化した DEAE Toyopearl 650 M (600 ml) に上清を注加した. 溶出は, NaCl 直線濃度勾配 (0 から 0.25 M) で行なった. 0.15 M NaCl 付近に溶出された GTP γ ³⁵S 結合画分 (400 ml) を集め, 限外濾過により 50 ml まで濃縮し, buffer C (0.1 M NaCl を含む buffer B) で平衡化した AcA34 カラム (800 ml) に注加した. GTP γ ³⁵S 結合画分 (200 ml) を集め, 400 ml の buffer D (コール酸を含まない buffer C) で希釈後, buffer E (0.3% コール酸を含む buffer D) で平衡化したオクチルセファロース (100 ml) に注加した. 同カラムを buffer F (0.5 M NaCl を含む buffer E) で洗浄後, 溶出は NaCl とコール酸の直線濃度勾配 (それぞれ 0.25 から 0.05 M 及び 0.3 から 1.2%) で行なった. GTP γ ³⁵S 結合画分を Gi/o として集めた.

$\beta\gamma$ サブユニット調製のために, Gi/o 溶液に 5 mM MgCl₂ 及び 10 mM NaF を加え, 一晚 buffer G (20 mM Tris, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 10 μ M AlCl₃, 0.1 M NaCl, 0.3% コール酸, 1 mM DTT 及び 0.1 mM PMSF) に対して透析後, 透析外液を交換し更に 3 時間, 室温で透析した. 以下の操作は室温で行なった. この Gi/o を buffer G で平衡化したオクチルセファロースに注加し, NaCl とコール酸の直線濃度勾配 (それぞれ 0.1 から 0.05 M 及び 0.3 から 1.2%) で溶出した.

2.2 ラット脳の細胞内分画

Sprague-Dawley 種雄ラット (体重 200-250 g) の脳ホモジネートを次の方法で分画した. ラット脳 30 g に 50 ml の buffer H (20 mM Tris, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF) を加え, 氷中でホモゲナイズした後 500 xg, 5 分間遠心, この沈渣を画分 I とした. その上清を更に 10,000 xg, 15 分間遠心し, 沈渣を画分 II とした. その上清を更に 100,000 xg, 60 分間遠心して得られた沈渣を少量の buffer H に懸濁, この標品を画分 III (ミクロソーム画分) とした. この最後のの上清を画分 IV として, 各画分をメチル基転移酵素測定用標品として実験に用いた.

2.3 メチル基転移酵素活性の測定

2.3.1 反応条件

メチル基転移酵素活性の測定は, 特に断らない限り次の条件で行った. 種々の濃度の G $\beta\gamma$ を 0.5 mg/ml ミクロソーム画分, 5 μ M [³H] S-adenosyl-L-methionine (SAM) とともに, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 1 mM CHAPS, 20 mM MOPS (pH 7.0) 中, 30°C でインキュベートした.

2.3.2 メチル基転移酵素活性の測定方法

上記の反応液を一定時間インキュベート後, 反応液の一定量 (15-90 μ l) を 4 cm² の濾紙 (東洋 514 A) にスポットし, 10% TCA (1 枚につき 10 ml) に浸して反応を停止, 更に未反応の SAM を除去するためにこの操作を 4 回反復した. その後濾紙を液シンバイアルに移し, 0.1 M NaOH 1 ml を加えて一晚室温でインキュベート, メチル基をメタノールとして溶出した後, アクアソール 2 を加えて放射活性を測定した. なお基質である $\beta\gamma$ サブユニットを除いた反応液の放射活性も同様に測定し, この値を $\beta\gamma$ サブユニットを含む反応液の放射活性値から引き, これを γ サブユニットに特異的に取り込まれた放射活性とした (濾紙法). もう一つの方法は一定量の反応液を取り, 直ちに SDS 溶液で反応停止後, SDS 電気泳動を行なった. クマシー染色後, G γ を含む部分のゲルを切り取り, 30% 過酸化水素水とともに 60°C, 6 時間インキュベートすることによりゲルを可溶化後, アクアソール 2 を加えて放射活性を測定した (SDS ゲル法).

2.4 High-performance liquid chromatography (HPLC) によるメチル化された G γ の分離

2.3.1 に記した方法の反応液 500 μ l を 2 時間インキュベート後, 100,000 xg, 1 時間遠心した. 沈渣には 8 M 尿素溶液 2 ml, また上清には固形尿素を終濃度 8 M となるように加えて溶解後, HPLC を用いてメチル化された G γ の分離を試みた. 装置は 665 A-11 liquid chromatography pump, L-5000 LC controller, 665 A variable wave length monitor (日立社製) を使用した. カラムは 5 C 8-300 逆相カラム (4.6 \times 150 mm, Nakarai Tesque) を使用した. 0.1% トリフルオロ酢酸を含む 10% から 60% のアセトニトリル直線濃度勾配により, 蛋白質を溶出 (流速 1 ml/min) し, 215 nm における吸光度で溶出蛋白質の検出を行なった. 得られた溶出分画 (各 1 ml) から 0.1 ml を取り, アクアソール 2 を加えて放射活性を測定した.

2.5 ミクロソーム画分の可溶化

ミクロソーム画分に界面活性剤 (コール酸, CHAPS,

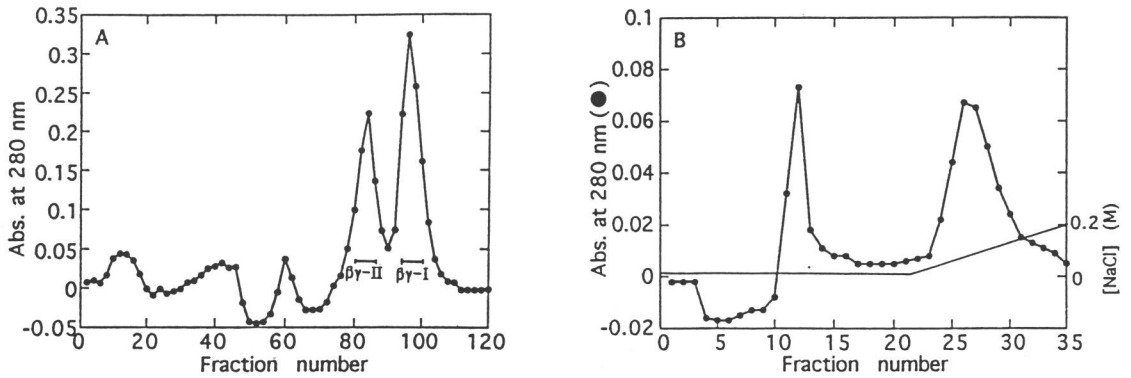


Fig. 2 Purification of the $\beta\gamma$ -subunits from Gi/o.
 A: After dialysis against Buffer G, the Gi/o mixture was loaded onto an Octyl-Sepharose column (2×30 cm) equilibrated with Buffer G. The column was washed with Buffer G, and the elution was then performed with linear concentration gradients of both NaCl and cholic acid from 0.1 to 0.05 M and from 0.3 to 1.2%, respectively. The elution profile with the linear concentration gradients is shown. Two solid bars ($\beta\gamma$ -I and $\beta\gamma$ -II) indicate the pooled fraction numbers.
 B: The $\beta\gamma$ -I and $\beta\gamma$ -II were dialyzed against Buffer J and loaded onto a DEAE-Sephacel column (2×7 cm) equilibrated with Buffer J. After the column was washed with Buffer J, elution was performed with a linear NaCl gradient from 0.02 to 0.2 M.

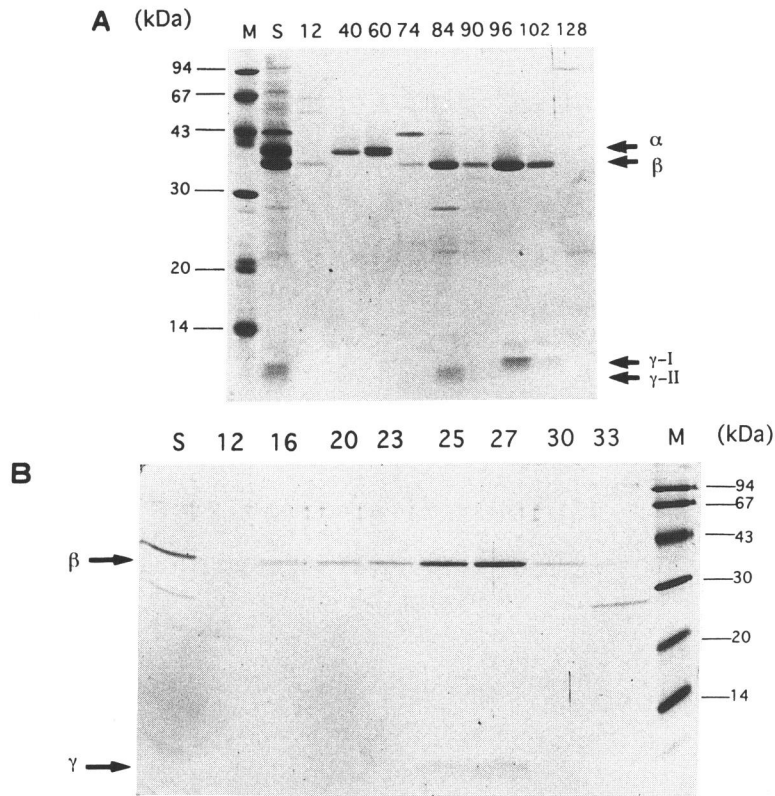


Fig. 3 SDS-PAGE patterns of the fractions in Fig. 2.
 A: SDS-PAGE pattern of the fractions of the Octyl-Sepharose (Fig. 2A).
 B: SDS-PAGE pattern of the fractions of the DEAE-Sephacel (Fig. 2B).
 The numbers shown on the top of the gel indicate fraction numbers. Lane S shows a starting material. Lane M shows molecular weight standards.

Tween 20, Triton X-100) を終濃度 1.5% となるように加え、4°C で 1 時間放置後、100,000 xg, 1 時間遠心した。この上清を可溶性ミクロソーム画分として実験に用いた。

ミクロソーム可溶性画分から界面活性剤を除去するために、コール酸と CHAPS で可溶化した標品に関しては、可溶性上清 1 ml を buffer I 300 ml (100 mM MOPS pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 1 mM DTT) に対し 4°C 一晚透析後、酵素活性の測定に用いた。一方、Tween 20 及び Triton X-100 で可溶化した標品は、以下に示す方法で界面活性剤濃度を可及的に低下せしめた。すなわち、可溶性上清 1 ml を buffer I 1 ml とともにセントリコン 30 (Grace 社) に移し、1,000 xg から 1,500 xg で 30 分間遠心した。遠心後再び buffer I を加えて遠心を繰り返す操作を数回行ない、界面活性剤の濃度を約 20 倍まで希釈した。

2.6 その他の方法

0.1% SDS を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、Laemmli²⁸⁾ の方法に準じ、15% の分離ゲルと 3% の濃縮ゲルを用いて行なった。尿素存在下の SDS-PAGE は、Swank and Munkres²⁹⁾ の方法に従って行なった。蛋白質濃度は Lowry *et al.*³⁰⁾ の方法、または 280 nm における吸光係数 (α サブユニットに対して $\epsilon^{1\%} = 9.3$, $\beta\gamma$ サブユニットに対して $\epsilon^{1\%} = 14.7$) を用いた。

3 成 績

3.1 牛脳 G 蛋白質における二種 $\beta\gamma$ -サブユニットの分離精製

Figs. 2, 3 に示したように、 AlCl_3 及び NaF 存在下のオクチルセファロースにより、 γ サブユニットの異なる二種の $\beta\gamma$ サブユニット ($\beta\gamma$ -I, $\beta\gamma$ -II) が $\alpha\beta\gamma$ 三量体から分離された (Figs. 2A, 3)。分子量の大きい方から γ -I, γ -II と名付けた。一方、二次元電気泳動から β サブユニットは同様のスポットを示し、両 $\beta\gamma$ サブユニット間で差を認めなかった (データを示していない)。得られた $\beta\gamma$ サブユニットには不純物として、SDS 電気泳動上、分子量約 23 kDa 及び 14 kDa のバンドを含んでいた。それらを除くために、 $\beta\gamma$ サブユニットを buffer J (20 mM 磷酸カリウム, pH 7.4, 20 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) に対して透析後、buffer J で平衡化した DEAE セファセルカラムに吸着させた。カラム体積の約 3 倍の同緩衝液でカラムを洗浄後、NaCl 直線濃度勾配 (20-200 mM) で $\beta\gamma$ サブユニットを溶出した。この操作により不純物はカ

ラムに吸着されずに洗い除かれ、 $\beta\gamma$ サブユニットは NaCl 濃度約 0.1 M で溶出された (Figs. 2B, 3)。Figs. 2B, 3 には $\beta\gamma$ -II の結果を示した ($\beta\gamma$ -I について得られた同様の結果は示していない)。これらの標品をメチル化の基質として以下の実験を用いた。

3.2 $G\gamma$ メチル基転移酵素の細胞内局在

ラット脳ホモジネートより分離した I-IV 各画分を、 $[\text{H}]$ SAM, $G\beta\gamma$ -I とともにインキュベート後、SDS-PAGE を行なった。そのオートラジオグラムの結果を Fig. 4 に示す。 $[\text{H}]$ -SAM の $[\text{H}]$ -メチルに由来する放射活性は明らかに $G\gamma$ に認められ、その他には検出されなかった。この $G\gamma$ へのメチル化は画分 III (ミクロソーム画分) で最も多く、次いで画分 II に認められた。この結果、以後の実験では $G\gamma$ メチル基転移酵素の検討に画分 III を用いた。

3.3 $G\gamma$ メチル基転移酵素活性測定法の検討

二種の $G\beta\gamma$, すなわち $\beta\gamma$ -I, $\beta\gamma$ -II を基質として、ラット脳ミクロソーム (画分 III) による $[\text{H}]$ SAM からのメチル化活性を検討した。

$\beta\gamma$ -I あるいは $\beta\gamma$ -II を基質として用いた場合、濾紙法と SDS-ゲル法で得られたメチル化活性の値はよく一

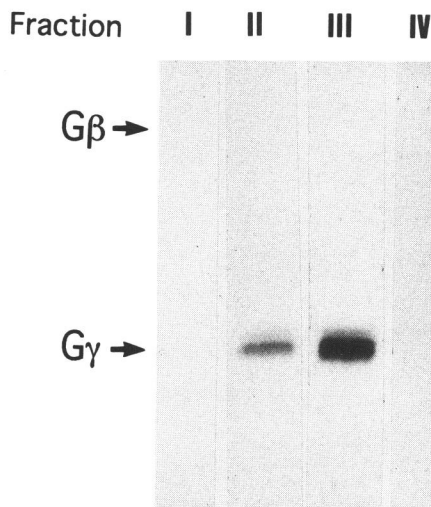


Fig. 4 Autoradiogram of $G\gamma$ labeled with S-adenosyl- $[\text{H}]$ -L-methionine in the presence of brain subfractions (I to IV, Materials and Methods) separated from rat brain homogenate. Methylation reaction for $G\gamma$ was performed in a solution containing 0.1 M MOPS, pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 5 μM $\beta\gamma$ -I, and 0.5 mg/ml each fraction (I, nuclear fraction; II, mitochondrial fraction; III, microsomal fraction; IV, cytosol fraction) for 2 hours at 30°C. After the incubation, aliquots (20 μl) were subjected to SDS-PAGE and autoradiogram was performed.

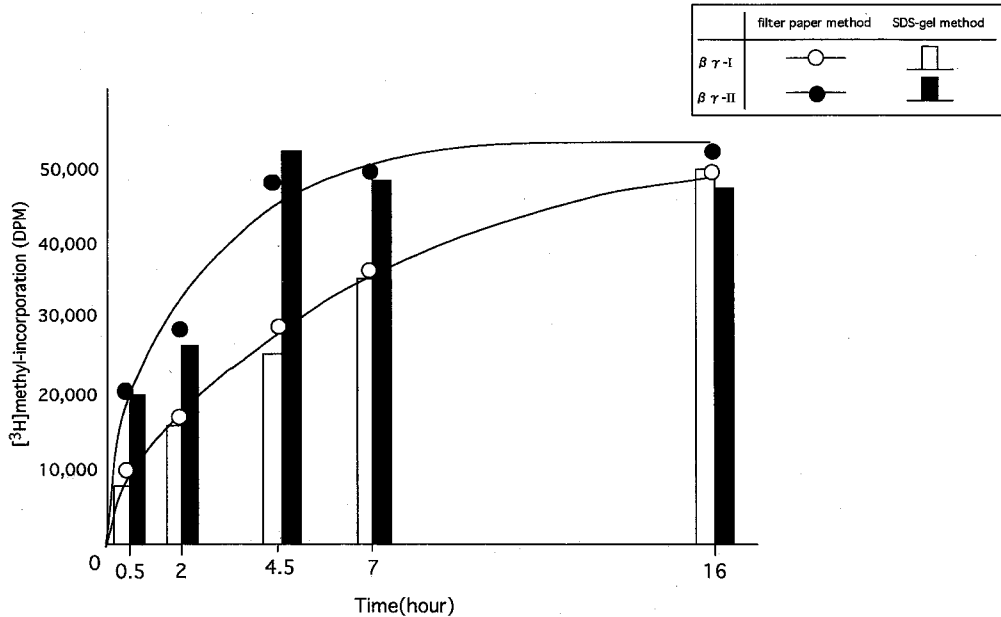


Fig. 5 Comparison of the two assay methods i. e., filter paper and SDS-gel methods, for the methylation of $\beta\gamma$ -subunits. At indicated times, 15-90 μ l aliquots from the incubation mixtures were spotted onto filter paper discs, and then the reaction was terminated with 10% TCA, or with 2% SDS solution. Enzymatic activity was determined by using the filter paper method (expressed as circles) or the SDS-gel method (expressed as bars) as described under "Materials and Methods". The [3 H] methyl-incorporations into $\beta\gamma$ -I (open circle or open bar) and $\beta\gamma$ -II (closed circle or closed bar) are shown.

致した(Fig. 5). すなわち濾紙法で得られた値は, G γ 以外の蛋白質へのメチル化を含まず, G γ のメチル化を特異的に測定していることが示された. [3 H]メチル基の取り込みは, $\beta\gamma$ -IIを基質とした場合が $\beta\gamma$ -Iを基質とした場合より常に高値であったが, 反応時間16時間で両者の値は飽和に達し, ほぼ同一の最大値を示した. このG γ メチル化の最大値は0.1 mol/molと計算された.

3.4 G γ メチル基転移酵素の反応速度論的検討

G $\beta\gamma$ (IまたはII)20 μ Mの時, 濾紙法で測定されたG γ への[3 H]メチル基の取り込みは30分まで直線性であった(Fig. 6A). 次いで種々の濃度の $\beta\gamma$ -I, $\beta\gamma$ -IIを用いて反応時間30分でのメチル化活性を測定した結果を, Fig. 6Bに示す. その酵素比活性(pmol/mg/min)は, G γ の異なる基質によって明らかな差が認められ, $\beta\gamma$ -IIへの活性が $\beta\gamma$ -Iよりも高値であった. 基質濃度2 μ Mにおけるその値は, $\beta\gamma$ -Iでは0.95 pmol/mg/minであるのに対し, $\beta\gamma$ -IIでは2.9 pmol/mg/minで, $\beta\gamma$ -Iへのメチル化の約3倍の速さであった. また両逆数プロット(Fig. 6C)から求めたミカエリス定数K m は, $\beta\gamma$ -I, $\beta\gamma$ -IIに対してそれぞれ, 2.8 μ M,

0.55 μ M, 最大速度V $_{max}$ は, それぞれ1.6 pmol/mg/min, 3.6 pmol/mg/minであった. よってこのG γ メチル基転移酵素にとって $\beta\gamma$ -IIは $\beta\gamma$ -Iよりも良い基質であると考えられた.

3.5 メチル化G $\beta\gamma$ の膜結合性の検討

酵素反応終了後, その反応液を100,000 xg, 1時間遠心し, その上清に固体尿素を終濃度8 Mになるように加え, また沈渣には8 M尿素溶液を加えて溶解し, HPLC-C8カラムによる逆相クロマトグラフィーを行なった(Fig. 7). $\beta\gamma$ -Iが基質の場合, 100,000 xg遠心後の沈渣からは画分33に放射活性のピークが認められたが, その上清では相当する画分に放射活性は検出されなかった(Fig. 7A). $\beta\gamma$ -IIが基質の場合, 100,000 xg遠心沈渣では画分33の他に画分36のピークが認められたが, 上清の放射活性はほとんど検出されなかった(Fig. 7B). 次いで, $\beta\gamma$ -Iが基質の場合の画分33を凍結乾燥後, 尿素/SDS-PAGEを行なった. 銀染色によるG γ のバンドは沈渣で著明であったが, 上清でも明らかに認められた. しかし, オートラジオグラフィーでは沈渣のG γ に強い放射活性が認められたが, 上清のG γ に放射活性は検出されなかった(Fig. 7C). この結

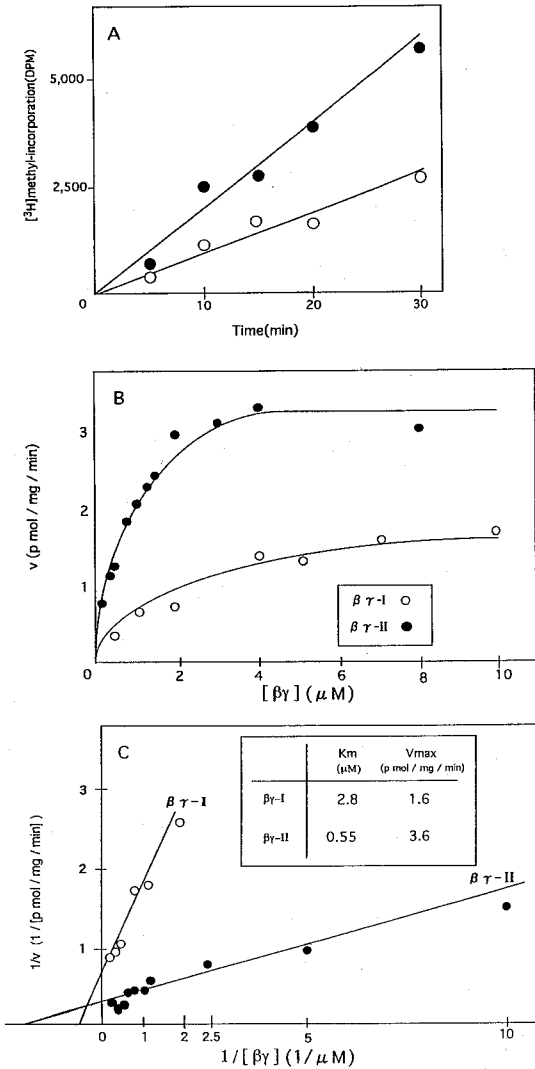


Fig. 6 Measurement of the Km and Vmax values of the G γ -carboxyl methyltransferase for different $\beta\gamma$ -subunits of bovine brain Gi/o. A: Time course of [³H] methyl-incorporation into the $\beta\gamma$ -I or $\beta\gamma$ -II. B: Specific activities for the methylation reaction of the $\beta\gamma$ -subunits are plotted against varied concentrations of $\beta\gamma$ -subunits. C: Double reciprocal plots of B.

果は、新たに G γ をメチル化された G $\beta\gamma$ は膜に結合することを示している。

3・6 G γ メチル化への G α の影響

視細胞の三量体 G 蛋白質トランスデューシン (T) において、T γ と T α の直接の相互作用が Fukada *et al.*¹⁹⁾ によって示唆されている。筆者ら²⁵⁾ は脳の三量体 G 蛋白質 $\beta\gamma$ -I, $\beta\gamma$ -II についても、トランスデューシ

ンと同じく、G γ と G α の直接の相互作用の存在を示唆した。更に $\beta\gamma$ -I, $\beta\gamma$ -II は、ともに G α との三量体形成に差のないことを示唆する結果を得ている²⁵⁾。それで本研究では G γ のメチル化に対する G α の影響について検討した (Fig. 8)。 $\beta\gamma$ -I あるいは $\beta\gamma$ -II を基質とした時、調べたすべての G α 濃度による G γ メチル化活性の変化は見られなかった。この結果は、G γ へのメチル化は、基質が $\beta\gamma$ 二量体でも $\alpha\beta\gamma$ 三量体でも差はなく、これは G γ の違いによっても左右されないことを示している。

3・7 G γ メチル基転移酵素の脳ミクロソームからの可溶化

脳ミクロソーム画分に界面活性剤 (コール酸, CHAPS, Tween 20, Triton X-100) 最終濃度 1.5% に加え、 $\beta\gamma$ -I への [³H] SAM からのメチル化を検討した。2 時間反応させた後、反応液の SDS-PAGE 後のオートラジオグラフィーでメチル化活性を検出した (Fig. 9A)。すべての界面活性剤存在下で G γ への放射活性の取り込みは認められず、界面活性剤自体がメチル化活性に影響を与えることが判明した。次いで、脳ミクロソームを同様に界面活性剤で処理後 100,000 xg 遠心を行ない、その上清の界面活性剤濃度を可及的に低下せしめた後、G γ メチル化活性を測定した。その結果、Tween 20 で可溶化後、この界面活性剤を除去した上清を用いた時、G γ への [³H] メチルの取り込みが認められた (Fig. 9B)。

4 考 察

筆者ら^{26,27)} はすでに、G 蛋白質 γ サブユニットの heterogeneity について蛋白質レベルで検討し、 β サブユニットが同一で、 γ サブユニットの異なる二種の G $\beta\gamma$ 、すなわち $\beta\gamma$ -I と $\beta\gamma$ -II の存在を示した。 γ -I, γ -II の一次構造は明らかに異なっており、N 末端 47 残基の相同性は 57% であった²⁷⁾。この γ サブユニットの異なる二種の G $\beta\gamma$ の生理的意義を探る目的で、筆者ら²⁵⁾ は GTP γ S の結合及び ADP-リボシル化の比較検討を行ってきたが、本研究では G γ の翻訳後修飾の最終段階である G γ メチル基転移酵素についての比較検討を行なった。

G γ はそれをコードする cDNA から、C 末端に CXXX の共通モチーフ (C; システイン, X; 任意のアミノ酸) を有し、Fig. 10 に示す過程によって翻訳後修飾を受けることが最近明らかにされた¹⁷⁾。geranylgeranyl transferase はサイトゾルに存在する^{21,31)} が、Clarke *et al.*³²⁾ は合成ペプチドを基質とし、carboxylmethyl transfer-

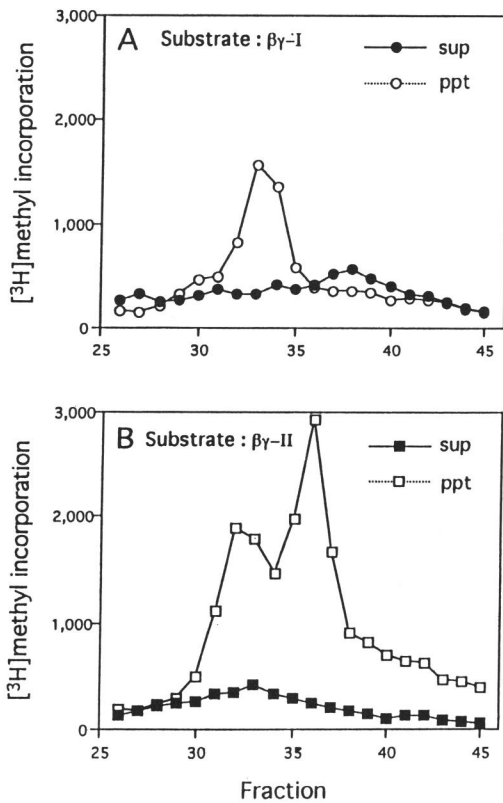
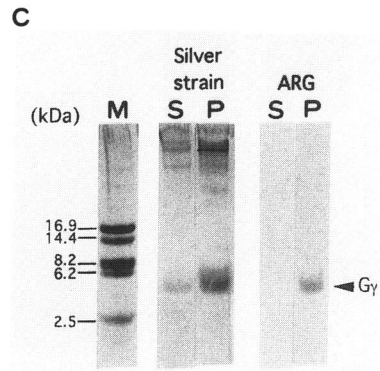


Fig. 7 Localization of newly-methylated $\beta\gamma$ -subunits of Gi/o in rat brain homogenate. Methylation of $\beta\gamma$ -I (A) or $\beta\gamma$ -II (B) was performed as described under "Materials and Methods". After incubation at 30°C for 2 hours, the reaction mixture was centrifuged at 100,000 x g for 30 min. The supernatant or the pellet was dissolved with solid urea and in 8 M urea, respectively, and then loaded onto an HPLC C_8 reverse phase column. After washing with 0.1% TFA and 10% acetonitrile, an elution was performed with the linear concentration gradient of acetonitrile from 10 to 50% over 40 min at a flow rate of 1 ml/min. One ml fraction was collected and 0.1 ml from each fraction was withdrawn for the measurement of radioactivity. Elution profiles of the radioactivity in the 100,000 x g pellet and supernatant from the reaction mixture are shown, ○ or □, pellet; ● or ■, supernatant. In the case of $\beta\gamma$ -I, the peak fraction from the pellet (fraction number 33) and the corresponding fraction from the supernatant were subjected to urea/SDS-PAGE. After electrophoresis, silver staining and autoradiogram (ARG) were carried out (C).



aseは脳ミクロソームに存在することを示した。本研究では、精製 $G\beta\gamma$ を基質とし $G\gamma$ メチル基転移酵素を検討し、この場合も同様にミクロソームに局在を認めた (Fig. 4)。この精製 $G\beta\gamma$ は脳ミクロソームによって、 γ -I、 γ -II ともに最大 0.1 mol/mol メチル化されると計算された (Fig. 5)。このことから両 $G\gamma$ の残りの 90% はすでにメチル化されていたと考えられる。すなわち、 $G\gamma$ は調製時点で 100% メチル化されているのではなく、メチル化後に脱メチル化が起きていることが示唆された。この脱メチル化が酵素的に起こるのか、あるいは平衡反応によるのかは不明である。そこで $G\gamma$ の脱メチル化の有無を調べる目的で、以下の実験を行なった。すなわち $G\beta\gamma$ をミクロソーム画分、 $[^3H]$ SAM とともに 3 時間 インキュベート後、SAM の 100 倍量の S-

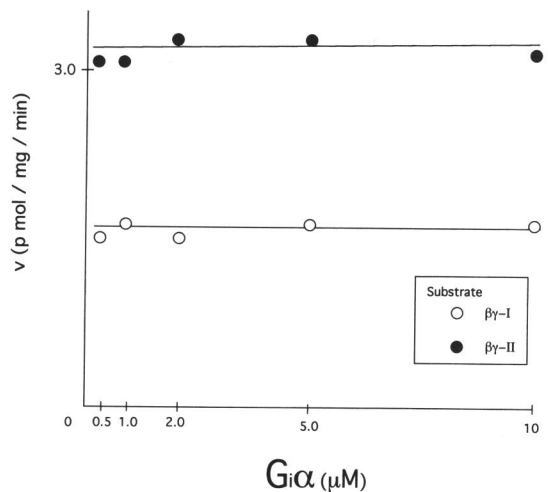


Fig. 8 Effect of α -subunit concentrations on the methylation of $\beta\gamma$ -subunits. The rate of $[^3H]$ methyl-incorporation of $\beta\gamma$ -I (○) into $\beta\gamma$ -II (●) was determined in the presence of various concentrations of $G\alpha$ as described under "Materials and Methods".

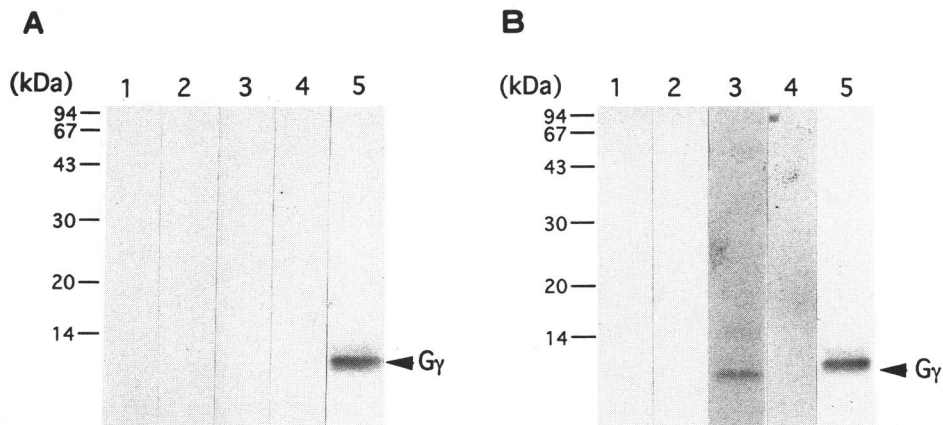


Fig. 9 Solubilization of $G\gamma$ -carboxyl methyltransferase from rat microsomal fractions. A: Rat brain microsomes were solubilized with Cholate, CHAPS, Tween 20, or Triton X-100, and the [^3H] methyl-incorporation into γ -I in the presence of detergents were detected by autoradiography as described under "Materials and Methods".: lane 1, solubilized by Cholate; lane 2, CHAPS; lane 3, Tween 20; lane 4, Triton X-100; lane 5, untreated membranes. B: The microsomal fractions were centrifuged after being solubilized with detergents and the supernatants were used as the enzyme sources after the detergents were removed as possible. Methylation reactions were done for 2 hours, and then the reactions were terminated with 2% SDS solution. [^3H] methyl-incorporations were detected by autoradiography after SDS-PAGE: lane 1, solubilized by Cholate; lane 2, CHAPS; lane 3, Tween 20; lane 4, Triton X-100; lane 5, untreated membranes.

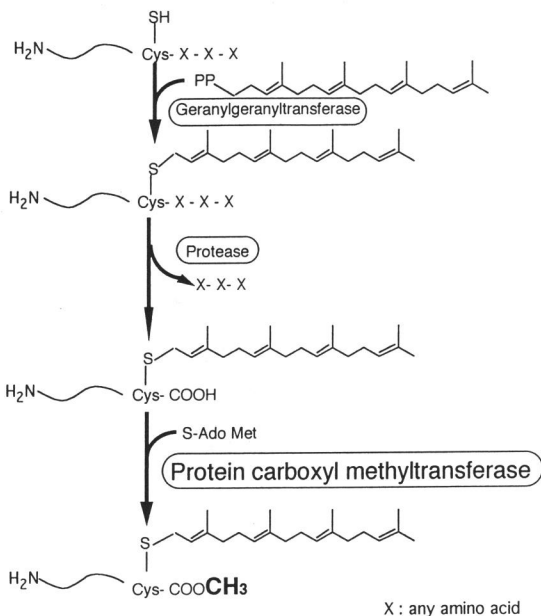


Fig. 10 Posttranslational modification process of $G\gamma$. adenosyl-L-homocysteine (SAH)を添加し、更にインキュベートを続行した。この時 $G\gamma$ に取り込まれた [^3H] メチルの放射活性に著明な低下は認められず、この条件で脱メチル化反応は起こっていないと考えられ

た。また反応液に細胞質成分を加えた場合も、 $G\gamma$ 放射活性の低下は認められなかった。以上の結果は両 $G\beta\gamma$ を用いた場合で同じであった。このことは、少なくとも平衡状態で γ -I、 γ -II の脱メチル化は起こっていないことを示唆するが、酵素的にも脱メチル化はないと考えられた。しかし、網膜を用いた実験では、 $T\gamma$ に取り込まれた [^3H] メチル放射活性の脱メチル化が酵素的に起こることが報告されている³³⁾。ラット脳で脱メチル化活性が見られなかったのは、インヒビターが存在するのがあるいは他に活性化因子が必要である可能性が考えられる。しかしいずれにせよ、脱メチル化された γ サブユニットは、酵素的に再メチル化されるといふ修復過程があることは確かである。

この $G\gamma$ メチル化は生理的にとどのような意味を持つのであろうか。同じ CXXX モチーフを持つカビの成長因子はアミノ酸 12 残基で、C 末端にイソプレニル化(ファルネシル化)及びカルボキシメチル化システインを持つペプチドである。これをアルカリ処理し、C 末端メチル基を加水分解した脱メチル化成長因子を用いた比較実験の結果、ファルネシル化のみでは細胞の増殖分化は十分ではなく、その生物活性の発現のためには、ファルネシル化とともにメチル化が必須であることが示さ

れている¹⁸⁾。一方、脳 G 蛋白質と同じく三量体 G 蛋白質である視細胞トランスデュースンのファルネシル化 γ サブユニット ($T\gamma$) は、逆相 HPLC によってメチル化されているものとメチル化されていないものに明確に分離された^{21,22,34)} (脳 G 蛋白質では同様操作で両者を分離できなかった)。そしてトランスデュースンにカップルした膜受容体 (メタロドプシン II) との相互作用には、メチル化 $T\gamma$ を持つ $T\beta\gamma$ が非メチル化 $T\gamma$ を持つ $T\beta\gamma$ よりも優れた作用を持つことが示されている³⁵⁾。本研究において、新たにメチル化された $G\beta\gamma$ は、反応後の遠心沈渣、すなわち膜画分から回収された (Fig. 7)。この結果は、 $G\gamma$ のメチル化が膜との親和性増大に関わっていることを示すと思われる、 $G\gamma$ メチル化の生理的意義を示唆する。膜に定着したメチル化 $G\beta\gamma$ は、メチル化 $T\gamma$ で観察されたように、膜受容体との相互作用にも影響している可能性が考えられる。

長時間のインキュベーションによって γ -I、 γ -II に取り込まれた飽和量の [³H]メチル標識は、ともに 0.1 mol/mol であった。すなわち、 γ -I、 γ -II のメチル化に得る容量は同じと考えられた。しかし $G\gamma$ メチル基転移酵素の比活性は、 $G\gamma$ の異なる基質によって明らかな差が認められ、この酵素にとって $\beta\gamma$ -II は $\beta\gamma$ -I よりも良い基質であると考えられた。一方筆者ら²³⁾ は、再構成 G 蛋白質 ($\alpha\beta\gamma$ -I、 $\alpha\beta\gamma$ -II) を用いた GTP γ S 結合実験から、GTP γ S の $\alpha\beta\gamma$ -I に対する結合速度は、 $\alpha\beta\gamma$ -II に対するそれより大きいこと、百日咳毒素による $G\alpha$ の ADP-リボシル化には $\alpha\beta\gamma$ -I が $\alpha\beta\gamma$ -II よりも良い基質であることを報告してきた。また分離した G 蛋白質アイソフォームの γ サブユニットの組成を調べた結果、どの G 蛋白質も γ -I、 γ -II がおよそ 1:1 の割合であったことから、 $\beta\gamma$ -I を有する G 蛋白質はより速いシグナル伝達に関わっている可能性が考えられた。本研究の結果、すなわち $G\gamma$ メチル基転移酵素は $\beta\gamma$ -I よりも $\beta\gamma$ -II を基質としてより利用するという結果は、上記とは逆であった。実験系が異なるので両者を同一には論じられないが、 γ サブユニットの構造上の差違が、G 蛋白質機能の調節に深く関わっていることは間違いないと思われる。メチル化機構も恐らく膜との結合促進を介してこの機能調節に関与していると考えられるが、その説明は今後の課題である。

ミクロソームに存在するカルボキシメチル基転移酵素は、現在まで分離精製はされていない。Clarke *et al.*³²⁾ はコール酸、CHAPS、Triton X-100、Zwittergent 3-14、Deoxycholate、Tween 20、Octyl Glucoside を用いて、ミクロソームから本酵素の可溶性

はできなかったと報告している。本研究の検討では、 $G\gamma$ メチル基転移酵素は界面活性剤に対して強い感受性を示し、調べたすべての界面活性剤存在下に酵素活性は認められなかった。このことは、メチル基転移酵素が界面活性剤によって失活したためか、あるいは抑制されたためと考えられる。界面活性剤処理後、可溶性画分を遠心分離し、透析または限外濾過によって界面活性剤を可及的に除去した後の標品についてメチル化活性を検討した結果、Tween 20 で可溶化した場合にその活性を認めた。Clarke *et al.*³²⁾ の報告とは異なった結果であったが、この事実は再現性があった。従って、この $G\gamma$ メチル基転移酵素の分離精製の可能性があり、今後本酵素の更なる生化学的解明が期待される。

5 要 約

ラット脳における $G\gamma$ カルボキシメチル基転移酵素の性質及び生理的意義について検討し、以下の知見を得た。

- 1) 脳ミクロソーム存在下で、SAM [³H]メチル基の $G\beta\gamma$ の γ サブユニット C 末端システインへの取り込みは反応時間 16 時間で飽和となり、その最大値は、0.1 mol/mol であった。この値は $\beta\gamma$ -I、 $\beta\gamma$ -II ではほぼ同じであり、メチル化し得る容量は異なった γ サブユニット間で同じと思われた。
- 2) $G\gamma$ メチル基転移酵素活性の $\beta\gamma$ -II に対する K_m 及び V_{max} は $\beta\gamma$ -I に対する値のそれぞれ 1/5、2.25 倍であった。すなわち、 γ サブユニットの一次構造の違いが本酵素活性に影響を与えており、 $\beta\gamma$ -II がより良い基質と考えられた。
- 3) $G\alpha$ によって $G\gamma$ のメチル化は影響を受けなかった。また本酵素活性は調べられたすべての界面活性剤によって阻害された。
- 4) 脳ミクロソーム画分をさまざまな界面活性剤で処理して可溶化後、界面活性剤を可及的に除去し、その酵素活性を調べた結果、Tween 20 で処理した標品で $G\gamma$ のメチル化が認められた。
- 5) 新たに γ サブユニットをメチル化された $G\beta\gamma$ は、膜への結合性が増大することが認められた。

謝 辞

本研究の御指導、御校閲をいただいた本学医学部生化学第 1 講座秋野豊明教授、本研究を遂行する機会をお与えいただきました本学医学部整形外科学講座石井清一教授、並びに御批判、御協力をいただいた生化学第 1 講座の諸先生に深謝いたします。

文 献

1. Gilman AG. G proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 1987, 56: 615-649.
2. Taylor CW. The role of G proteins in transmembrane signalling. *Biochem J* 1990, 272: 1-13.
3. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 1991, 252: 802-808.
4. Tang WJ, Gilman AG. Type-specific regulation of adenylate cyclase by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Science* 1991, 254: 1500-1503.
5. Park D, Jhon DY, Lee CW, Lee KH, Rhee SG. Activation of phospholipase C isozymes by G protein $\beta\gamma$ subunits. *J Biol Chem* 1993, 268: 4573-4576.
6. Codina J, Stengel D, Woo SLC, Birnbaumer L. β -Subunits of the human liver Gs/Gi signal-transducing proteins and those of bovine retinal rod cell transducin are identical. *FEBS Lett* 1986, 207: 187-192.
7. Levine MA, Smallwood PM, Moen Jr PT, Helman LJ, Ahn TG. Molecular cloning of $\beta 3$ subunit, a third form of the G protein β -subunit polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 2329-2333.
8. Fong HKW, Amatruda III TT, Birren BW, Simon MI. Distinct forms of the β subunit of GTP-binding regulatory proteins identified by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84: 3792-3796.
9. Fong HKW, Hurley JB, Hopkins RS, Miake-Lye R, Johnson MS, Doolittle RF, Simon MI. Repetitive segmental structure of the transducin β subunit: Homology with the *CDC4* gene and identification of related mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83: 2162-2166.
10. Hurley JB, Fong HKW, Teplow DB, Dreyer WJ, Simon MI. Isolation and characterization of a cDNA clone for the γ subunit of bovine retinal transducin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81: 6948-6952.
11. Yatsunami K, Pandya BV, Oprian DD, Khorana HG. cDNA-derived amino acid sequence of the γ subunit of GTPase from bovine rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82: 1936-1940.
12. Robishaw JD, Kalman VK, Moomaw CR, Slaughter CA. Existence of two γ subunits of the G proteins in brain. *J Biol Chem* 1989, 264: 15758-15761.
13. Gautam N, Northup J, Tamir H, Simon MI. G protein diversity is increased by associations with a variety of γ subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 7973-7977.
14. Cali JJ, Balcueva EA, Rybalkin I, Robishaw JD. Selective tissue distribution of G protein γ subunits, including a new form of the γ subunits identified by cDNA cloning. *J Biol Chem* 1992, 267: 24023-24027.
15. Sohma H, Hashimoto H, Ohguro H, Akino T. Two γ -subunits, γ -I and γ -II, complex with the same β -subunits in bovine brain G-proteins (Gi/o). *Biochem Biophys Res Commun* 1992, 184: 175-182.
16. Sohma H, Hashimoto H, Hiraike N, Ohguro H, Akino T. Identification of a novel γ -subunit from bovine brain GTP binding regulatory proteins (Gi/o). *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 190: 849-856.
17. Clarke S. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem* 1992, 61: 355-386.
18. Anderegg RJ, Betz R, Carr SA, Crabb JW, Duntze W. Structure of *Saccharomyces cerevisiae* mating hormone a-factor. *J Biol Chem* 1988, 263: 18236-18240.
19. Fukada Y, Ohguro H, Sato T, Yoshizawa T, Akino T. $\beta\gamma$ -Subunits of bovine transducin composed of two components with distinctive γ -subunits. *J Biol Chem* 1989, 264: 5937-5943.
20. Hancock JH, Cadwallader K, Marshall CJ. Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21^{K-ras(B)}. *EMBOJ* 1991, 10: 641-646.
21. Reiss Y, Goldstein JL, Seabra MC, Casey PJ, Brown MS. Inhibition of purified p21^{ras} farnesyl: protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell* 1990, 62: 81-89.
22. Bernard KK, Yamane HK, Ota IM, Clarke S. The γ subunit of G-protein is methyl esterified at a C-terminal cysteine. *FEBS Lett* 1990, 260: 313-317.
23. Backlund Jr PS, Simonds WF, Spiegel AM. Carboxyl methylation and COOH-terminal processing of the brain G-protein γ -subunit. *J Biol Chem* 1990, 265: 15572-15576.
24. Yamane HK, Farnsworth CC, Xie H, Howald W, Fung BBK, Clarke S, Celb MH, Glomset JA. Brain G protein γ subunits contain an all-

- trans-trans-geranylgeranyl-cysteine methyl ester at their carboxyl termini. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 5868-5872.
25. Sohma H, Hashimoto H, Hiraike N, Ohguro H, Akino T. Different functional forms of G-protein $\beta\gamma$ -subunits, $\beta\gamma$ -I and $\beta\gamma$ -II, in bovine brain. *Biochim Biophys Acta* 1993, 1178: 111-116.
 26. Milligan G, Klee WA. The inhibitory guanine nucleotide-binding protein (Ni) purified from bovine brain is a high affinity GTPase. *J Biol Chem* 1985, 260: 2057-2063.
 27. Sternweis PC, Robishaw JD. Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J Biol Chem* 1984, 259: 13806-13813.
 28. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680-685.
 29. Swank RT, Munkres KD. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* 1971, 39: 462-477.
 30. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AR, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193: 256-275.
 31. Finegold AA, Johnson DI, Farnsworth CC, Celb MH, Judo SR, Glomset JA, Tamanoi F. Protein geranylgeranyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae* is specific for Cys-Xaa-Xaa-Leu motif proteins and requires the CDC43 gene product but not the DPRI gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 4448-4452.
 32. Stephanson RC, Clarke S. Characterization of a rat liver protein carboxyl methyltransferase involved in the maturation of protein with the-CXXX C-terminal sequence motif. *J Biol Chem* 1992, 267: 13314-13319.
 33. Perez-Sala D, Eng WT, Canada FJ, Rando RR. Methylation and demethylation of guanine nucleotide-binding protein of retinal rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 3043-3046.
 34. Fukada Y, Takao T, Ohguro H, Yoshizawa T, Akino T, Shimonishi Y. Farnesylated γ -subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature* 1990, 346: 658-660.
 35. Ohguro H, Fukada Y, Takao T, Shimonishi Y, Yoshizawa T, Akino T. Carboxyl methylation and farnesylation of transducin γ -subunit synergistically enhance its coupling with metarhodopsin II. *EMBOJ* 1991, 10: 3669-3674.
-
- 別刷請求先：
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学医学部生化学第1講座 橋本英樹