



Title	心臓におけるGTP結合蛋白 サブユニットの各アイソフォームの特異的発現と局在
Author(s)	村元, 信之介
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第3346号
Issue Date	1994-03-25
DOI	10.11501/3095145
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/51189
Type	theses (doctoral)
Note	短縮題名: 心臓のG蛋白質 サブユニットの特異的発現
File Information	000000272650.pdf



[Instructions for use](#)

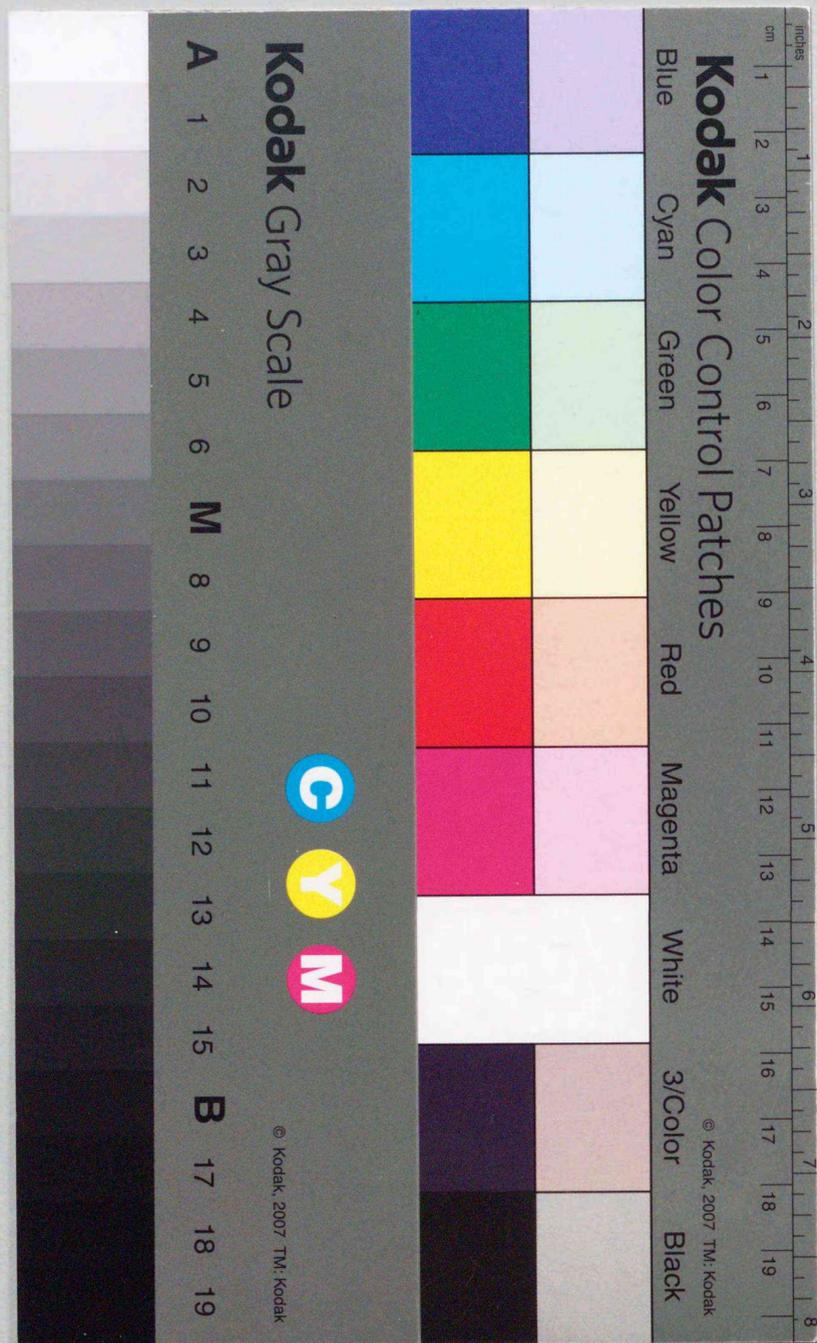
心臓におけるGTP結合蛋白質 β サブ
ユニットの各アイソフォームの特異
的な発現と局在

北海道大学医学部循環器内科

村元 信之介

短縮題名

心臓のG蛋白質 β サブユニットの特異的発
現



GTP結合蛋白質（G蛋白質）は $\alpha\beta\gamma$ 三量体構造からなる膜蛋白質で，細胞膜受容体とエフェクターの間において情報の変換増幅因子として存在する．G蛋白質 α サブユニットはグアニンヌクレオチド結合性とGTP水解活性を有する．ホルモンや神経伝達物質が受容体に結合すると α サブユニットに結合しているGDPが放出されGTP結合型の α サブユニット（活性型）と $\beta\gamma$ サブユニットに解離し，遊離した α サブユニットはエフェクターを活性化する． α サブユニットに内在するGTPase活性によりGTPはGDPに水解され， α サブユニットはGDP結合型（不活性型）となり $\beta\gamma$ サブユニットと再び会合し三量体に戻る¹⁻⁷⁾．

従来よりいくつかのエフェクターが α サブユニットにより活性化されることが知られている³⁾．一方， $\beta\gamma$ サブユニットは α サブユニットを細胞膜にとどめ受容体との連関を保つ役割を担っていると考えられてきた．しか

し最近になり， $\beta\gamma$ サブユニットもエフェクターへの直接作用を有する可能性が多数報告されている．酵母の接合因子情報伝達系においては $\beta\gamma$ サブユニットに相当するSTE4-STE18蛋白質が直接エフェクターと相互作用することが報告されている⁸⁾．哺乳類では， $\beta\gamma$ サブユニットがアデニルサイクラーズ活性に直接および間接的に影響を及ぼすことが明らかとされている⁹⁾．その他，心臓のKチャンネルの活性化¹⁰⁾，ホスホリパーゼA₂¹¹⁾，ホスホリパーゼC β_2 ¹²⁾¹³⁾，受容体キナーゼ¹⁴⁾¹⁵⁾等が $\beta\gamma$ サブユニットにより直接活性化されることが報告されている．

現在までに4種類の β サブユニットがクローニングされており¹⁶⁻¹⁹⁾ (β_1 ， β_2 ， β_3 ， β_4) 蛋白質レベルでは β_1 ， β_2 ， β_3 が同定されているが²⁰⁻²³⁾，各アイソフォームの機能的な違いについてはほとんど知られていない． β サブユニットは各アイソフォーム

間のアミノ酸配列の相同性が非常に強いためその機能には大きな差はないと考えられてきたが、最近の下垂体培養細胞を用いた実験から、 β サブユニットの種類が受容体とエフェクターの連関の特異性を決める可能性が示された²⁴⁾。

本研究の目的は、心臓におけるG蛋白質 β サブユニット各アイソフォームの発現をmRNAおよび蛋白質レベルで検討し、脳、網膜における各アイソフォームの発現と比較する事により、心臓における情報伝達系の特異性を明らかにすることにある。

【方法】

1. cDNAおよび抗 β サブユニット抗体

β_1 , β_3 , β_4 のcDNAは、pCDM8プラスミドベクターに組み込まれた形でDr. A. M. Spiegel (NIH, USA) より、 β_2 のcDNAは、岡山-Bergクローニングベクターに組み込まれた形で堅田利明先生(東京大学

薬学部)より譲り受けた。 β_1 はウシの網膜¹⁶⁾、 β_2 はヒトの副腎¹⁷⁾、 β_3 はヒトの網膜¹⁸⁾、 β_4 はマウスの脳¹⁹⁾よりクローニングされている。

ウエスタンブロットの解析には、Dr. Bernard K.-K. Fung (UCLA, USA)より譲渡された抗 β サブユニットポリクローナル抗体(β -636, β -637, β -638)²²⁾を使用した。これらの抗体はヒト β サブユニットの β_1 , β_2 , β_3 各アイソフォーム間で最も相同性が低い26~39番のアミノ酸配列に相当する合成ペプチドLAP-636 (ADATLSQITNNIDP), LAP-637 (GDSTLTQITAGLDP), LAP-638 (ADVTLAELVSGLEV)をウサギに接種し得られたものである。

2. 実験動物

雄性 Wistar Kyoto ラット (WKY: 10週齢、体重 約265g) を使用した。

3. 組織粗膜標本の調製

ラットをジエチルエーテルにて麻酔した後、心臓および脳を摘出した。組織はすばやく液

体窒素にて凍結し-80℃に保存した。また雌乳牛より網膜を得、同様に凍結保存した。各組織を4℃ STE緩衝液(0.25M Sucrose, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5, 50KIU/ml Aprotinin)に浸し、ポリトロンでホモジェナイズした(speed 6, 60秒間)。ホモジェネートを1,000×gで10分間遠心し得られた上清を105,000×gで1時間遠心し、得た上清は細胞質分画として保存、ペレットはSTE緩衝液に懸濁し、再度105,000×gで1時間遠心分離し、適量のTE緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5, 50KIU/ml Aprotinin)に懸濁し粗膜標本とした²⁵⁾。蛋白質の定量にはローリー法を使用した²⁶⁾。標準蛋白質としてはBovine Serum Albumin (Sigma,USA)を用いた。

4. Total RNA の抽出

各臓器よりAGPC法(acid guanidium thiocyanate phenol chloroform extraction)²⁷⁾にてtotal RNAを抽出した。OD260nmおよびOD280nmを

吸光光度計にて測定し、両者の比が1.9-2.0であるものを使用した。

5. DNAプローブの作製

β_1 , β_3 , β_4 のcDNAは、pCDM8プラスミドベクターをEcoRIで消化しそれぞれ1381bp, 1050bp, 1135bpのフラグメントとして得た。各cDNAフラグメントは低融点アガロースゲルにて泳動分離した後、フェノール/クロロフォルム抽出にて精製した。 β_2 のcDNAは岡山-BergクローニングベクターをSacII, SmaIで消化し、コーディングリジョンを含む1169bpのcDNAフラグメントを得、同様に抽出精製した。それぞれのcDNAフラグメントはランダムプライム法²⁸⁾にて50 μ Ciの α^{32} P-dCTP (Amersham, England)存在下に標識した後、Sephadex G50 (Stratagene, USA)にて未反応の α^{32} P-dCTPを除去してプローブを精製した。

6. ノザンプロット解析

各組織のtotal RNA 30 μ gを1.2%アガロー

ス／ホルムアルデヒドゲルにて泳動分離した後、Hybond-N+ ナイロンメンブレン(Amersham, England) にキャピラリートランスファーし80℃, 2時間のベイクングにて固定した。メンブレンはハイブリダイゼーション液 (0.75M NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.5, 2.5mM EDTA, 1% SDS, 20mg/ml Ficoll 400, 20mg/ml polyvinylpyrrolidone, 20mg/ml bovine serum albumin, 50% deionized Formamide, 100 μg/ml denatured sperm salmon DNA) で42℃, 24~48時間プレハイブリダイズした後、標識プローブおよび10% dextran sulfate を加えたハイブリダイゼーション液を42℃, 12~24時間ハイブリダイズした。その後、0.3M NaCl, 0.3M Na₃ citrate·2H₂O, pH7.0, 0.1% SDSで42℃, 15分(2回), 15mM NaCl 1.5mM Na₃ citrate·2H₂O, pH7.0, 0.1% SDSで65℃, 30分(2回)の洗浄の後、プラスチックバックに密封しX線フィルム(Hyperfilm-MP, Amersham, England) に-80℃で10日~14日露光した。検出されたmRNAのサイズは同時に泳動

したRNAマーカー(0.24-9.5kb RNA Ladder, BRL, USA) より求めた。

7. 発現 mRNA量の定量

各 mRNAの定量にはFUJIXバイオ・イメージングアナライザーBAS2000(富士写真フィルム)を使用した。ラジオアイソトープでラベルされたフィルターをイメージングプレートに露光し、コンピューターにてデジタル画像処理されたmRNAのバンドの濃淡から放射線量を決定した。放射線量の単位A.U. (arbitrary unit) は任意であり同一フィルター上のバンドの比較にのみ用いた。

8. ウェスタンブロット解析

各組織の細胞質および粗膜標本をそれぞれ50 μgづつ11% SDSポリアクリルアミド電気泳動にて分離した後²⁹⁾, PVDFメンブレン(ProBlott, Applied Biosystems, USA) に電氣的にブロッティングした(85V, 8時間)。メンブレンを5%ドライミルク入りTTBS液(20mM Tris.HCl, 0.5M NaCl, pH7.5,

0.05% v/v Tween20) にてブロッキングし, 各アイソフォームに特異的な一次抗体を4℃, 8時間反応させた後, 1 μ Ciの¹²⁵I-プロテインA (DuPont, USA) を室温にて3時間反応させた. メンブレンはX線フィルム (Amersham, England) に2~4日露光し特異的なバンドを検出した. 検出したバンドのサイズは, 同時に泳動した分子量マーカー (Rainbow Marker, Amersham, England) より求めた. また, 細胞質分画における β サブユニットの存在形態を調べるために, カットオフ分子量が10万のCentricon100 (Amicon, USA) にて心室の細胞質分画を遠心分離し, 濃縮液と濾過液を得, それぞれの分画についてウエスタンブロットを施行した.

9. 発現蛋白質の定量

¹²⁵IプロテインAにて検出したバンドは, 前述のバイオイメージングアナライザーを用い解析した. 各臓器間の β サブユニットの発現

量の比較は膜と細胞質の放射線量の和を用い, 蛋白1 μ gあたりの放射線量(A.U./ μ g)を比較した. また各臓器における β サブユニットの膜分画および細胞質分画への分布を比較するために, 各個体各臓器から得られた膜蛋白量, 細胞質蛋白量(mg)を同一個体の両分画における蛋白1 μ gあたりの放射線量(A.U./ μ g)と掛け合わせることで総量を求め, それぞれの分画の占める割合を検討した.

10. 統計処理

データはmean \pm S.D.で表示し, 各群間のデータの比較はF testおよびunpaired t testを用いて行った. $p < 0.05$ をもって有意差とした.

【結果】

1. ノザンブロット

いずれの臓器においても β_1 , β_2 , β_3 のmRNAのサイズはそれぞれ3.3 kb, 1.6 kb, 1.7 kbであった. ただし, ウシの網膜の β_1

は2.9kbであった。 β_1 , β_2 では明らかに脳で発現が強かったが, β_3 は心室での発現が強く,対照的であった。(β_1 ; 脳 886 \pm 196 A.U., 心室 194 \pm 43 A.U., $p < 0.01$.)

β_2 ; 脳 476 \pm 38 A.U., 心室 241 \pm 28 A.U., $p < 0.01$. β_3 ; 脳 53 \pm 28 A.U., 心室 143 \pm 36 A.U., $p < 0.01$. $n = 5$) (Fig 1,2)

また,ウシの網膜においては β_1 の発現が他の臓器と比べ著しく強かった.また心房,大動脈も加え比較したところ, β_1 , β_2 の発現は網膜,脳で強く,他の臓器に明らかな差は認めなかった. β_3 の発現は心室で一番強く,次に心房で発現が強かった($n = 3$). β_4 では洗いの条件をハイストリンジェンシーにしたもかかわらず多数のバンドが出現し,mRNAの同定が困難であった.

2. ウェスタンブロット

β -636 (β_1), β -638 (β_3)で36kDa, β -637 (β_2)で35kDaのバンドが検出された. β_1 , β_2 は脳での発現が心

室よりも強かったが, β_3 の発現は心室の方が脳よりも強かった.(β_1 ; 脳 22.6 \pm 2.86 A.U./ μ g, 心室 5.0 \pm 1.08 A.U./ μ g. β_2 ; 脳 33.7 \pm 0.88 A.U./ μ g, 心室 9.6 \pm 0.54 A.U./ μ g. β_3 ; 脳 6.1 \pm 0.59 A.U./ μ g, 心室 9.8 \pm 1.45 A.U./ μ g, $n = 3$) (Fig.3,4)

膜および細胞質における β サブユニットの分布は臓器特異的でありかつ各アイソフォームに特異的であった.脳では β_1 , β_2 は膜での発現量が多かったが, β_3 は細胞質に多かった.心室では β_1 , β_2 , β_3 のすべてが細胞質により多く発現していた.(β サブユニットの膜における発現比.脳; β_1 77 \pm 3.6%, β_2 81 \pm 0.5%, β_3 27 \pm 10.8%.

心室; β_1 12 \pm 3.7%, β_2 34 \pm 1.0%, β_3 12 \pm 6.0%) (Fig.5)

カットオフ分子量が10万のCentricon100 (Amicon, USA)を用いた結果から,心室の細胞質の β_1 , β_3 サブユニットは分子量10万以上の複合体を形成している事が示唆さ

れた。(Fig.6)

【考按】

本研究において心臓におけるG蛋白質 β サブユニットのアイソフォームの発現が臓器特異的であり、細胞質に比較的大量に発現していることが明らかとなった。

1. β サブユニットの役割

これまでに β サブユニットとして4種類、 γ サブユニットとして7種類の蛋白がクローニングされているが³⁰⁻³⁴⁾、生体内に存在する $\beta\gamma$ サブユニットは生理的条件下では分離することではなく、単離したサブユニットは $\beta\gamma$ 二量体としてのみ研究されている³⁵⁻³⁹⁾。4種類の β サブユニットはそれぞれ340個のアミノ酸からなり、各サブユニット間の相同性は約80%と極めて高い。一方、7種類の γ サブユニットは75個のアミノ酸からなるが相同性は40%と低い⁴⁾⁷⁾¹⁹⁾⁴⁰⁾。さらに γ サブユニットはC末端のシステインがプレニル化

を受けるが、アイソフォームによりプレニル基が異なるなど、 β サブユニットと比べ多様性が強く、 $\beta\gamma$ サブユニット二量体としての機能を決定しているのは γ サブユニットであると考えられてきた⁴⁰⁾⁻⁴²⁾。

しかし最近になり、各 β サブユニットのアンチセンスオリゴヌクレオチドをラットの下垂体培養細胞(GH3)に用い特定の β サブユニットの発現を抑制する実験から、 β サブユニットのアイソフォームが受容体とエフェクター(カルシウムチャンネル)の連関の特異性を決めている可能性が示された：ムスカリン受容体を刺激しカルシウムチャンネルを抑制するためには β_3 が必要であり、ソマトスタチン受容体を刺激しカルシウムチャンネルを抑制するためには β_1 が必要であった²⁴⁾。この結果は、 β サブユニットアイソフォームの発現の違いにより、各臓器・組織に特異的な膜情報伝達系のバランスが形成されている可能性を示している。

2. 心臓に特異的な β サブユニットの発現形式

ノザンブロット解析から心臓における β_3 mRNAの発現が脳と比較し極めて強く特異的であることが示された。ウエスタンブロットによる検討でも同様に心臓での β_1 , β_2 の発現量が少なく, β_3 の発現量が多い事が示された。網膜の桿状体細胞に β_1 が特異的に存在することがわかっているが⁴³⁾, 一般的に各 β サブユニットは多くの臓器で普遍的に存在すると考えられており⁷⁾¹⁶⁻¹⁹⁾, 心臓に特異的な β サブユニットの発現形式が認められたことは興味深い。

3. 心臓の細胞質における β サブユニットの特異的発現

本研究において, 心臓においては, すべての β サブユニットが細胞質により多く存在することを明らかにした。アイソフォーム間でもその分布は異なり β_2 は膜にも同程度存在したが, β_1 , β_3 は細胞質での発現が強かつ

た。現在までに, 細胞質における三量体G蛋白質の占める役割に関する研究は少ない。腎細胞で $G_{i\alpha_3}$ がゴルジに存在し蛋白の輸送に関わる可能性が報告され⁴⁴⁾, Fung等は牛の網膜の円錐体細胞に β_3 が特異的に発現し, かつそのほとんどが細胞質に存在することを報告したが²²⁾, 細胞質でのその生理的な役割については明らかになっていない。網膜の桿状体細胞に特異的な β_1 が $\beta\gamma$ 二量体としてフォスフェーシンというリン蛋白質と結合して細胞質に存在しているのと同様に, β_3 もフォスフェーシン様蛋白質と結合した形で存在すると報告されている²³⁾。心筋の細胞質に存在する β サブユニットについては, セントリコンを用いた実験から, 分子量10万以上の複合体を形成していることが推測される。理論上, $\alpha\beta\gamma$ 三量体でも分子量8~9万であり, 三量体または $\beta\gamma$ 二量体単独で存在している可能性は少なく, 他の蛋白質に結合しているか, あるいは膜構造に結合しているものと思われ

る。網膜と同様に， $\beta\gamma$ 二量体として存在し，フォスフェーシオン様蛋白質と結合している可能性もあり⁴⁵⁾，今後，免疫沈降法を用いた結合蛋白質の同定が必要とされる。三量体G蛋白質は膜を介する情報伝達だけではなく，低分子量G蛋白質⁴⁶⁾と同様に細胞の分化，増殖に密接に関与していると考えられており⁴⁷⁾，細胞質における局在が細胞内での生理作用を解明する糸口となるかもしれない。

【結語】

1. ラットの心臓における β_3 サブユニットのmRNAレベルの発現は，脳と比較して，有意に強く，蛋白レベルにおいても同様であった。
2. 心臓における β サブユニット(β_1 ， β_2 ， β_3)の発現はすべて細胞膜分画よりも細胞質分画に多量に分布していた。
3. 心臓の細胞質分画における β サブユニットは分子量10万より大きな複合体として存

在することが推定された。

【謝辞】

稿を終えるにあたり御指導，御校閲を賜わりました北海道大学医学部循環器内科学講座，北島 顕教授に深甚なる謝意を表します。また，直接御指導を頂きました村上 猛先生，貴重な御助言を頂きました川口 秀明先生，岡本 洋先生，浦沢 一史先生，御協力を頂きました北海道大学循環器内科学講座教室員の皆様，実験助手神田 扶由子さんに厚く御礼申し上げます。

- 1) Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1991) :The GTPase Superfamily: Conserved Structure and Molecular Mechanism. *Nature* **349**: 117-127.
- 2) Gilman AG (1987) : G proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals. *Ann Rev Biochem* **56**: 615-649.
- 3) Neer EJ, Clapham DE (1988) : Roles of G protein subunits in transmembrane signaling. *Nature* **333**: 129-134.
- 4) Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991) : Diversity of G Proteins in Signal Transduction. *Science* **252**: 802-808.
- 5) Spiegel AM, Shenker A, Weinstein LS (1992) : Receptor-Effector Coupling by G Proteins: Implications for Normal and Abnormal Signal Transduction. *Endocrine Rev* **13**: 536-565.
- 6) Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuyu M, Satoh T (1991) : Structure and Function of Signal-Transducing . *Annu Rev Biochem* **60**: 349-400.
- 7) Helper JR, Gilman AG (1992) : G proteins. *Trends Biochem Sci* **17** : 383-387
- 8) Whiteway M, Hougan L, Dignard D, Thomas DY, Bell L, Saari GC, Grant FJ, O'Hara P, Mackey VL (1989) : The STE4 and STE18 Genes of Yeast Encode Potential β and γ Subunits of the Mating Factor Receptor-Coupled G Protein. *Cell* **56** : 467-477.
- 9) Tang W-J, Gilman AG (1991) : Type-specific Regulation of Adenylyl Cyclase by G Protein $\beta\gamma$ Subunits. *Science* **254** : 1500-1503.
- 10) Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987) :The $\beta\gamma$ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K^+ channel in heart. *Nature* **325** : 321-326.
- 11) Jelsema CL, Axelrod J (1987) : Stimulation of phospholipase A_2 activity in bovine rod outer segments by the $\beta\gamma$ subunits of transducin and its inhibition by the α subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** :3623-3627.
- 12) Camps M, Carozzi A, Schnable P, Scheer A, Parker PJ, Gierschik P (1992) : Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- β_2 by G protein $\beta\gamma$ -subunits. *Nature* **360** : 684-686.
- 13) Kats A, Wu D, Simon MI (1992) : Subunits $\beta\gamma$ of heterotrimeric G protein activate β_2 isoform of phospholipase C. *Nature* **360** : 686-689.
- 14) Haga K, Haga T (1992) : Activation by G protein $\beta\gamma$ Subunits of Agonist-or Light-dependent Phosphorylation of Muscarinic Acetylcholine Receptors and Rhodopsin. *J Biol Chem* **267** : 2222-2227.
- 15) Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) : Role of $\beta\gamma$ Subunits of G proteins in Targeting the β -Adrenergic Receptor Kinase to Membrane-Bound Receptors. *Science* **257** : 1264-1267.
- 16) Sugimoto K, Nukada T, Tanabe T, Takahashi H, Noda M, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Hirose T, Inayama S, Numa S (1985) : Primary structure of the β -subunit of bovine transducin deduced from the cDNA sequence. *FEBS lett* **197** : 305-310.
- 17) Gao B, Gilman A G, Robishaw J D (1987) : A second form of the β subunit of signal-transducing G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** : 6122-6125.
- 18) Levine M A, Smallwood P M, Moen P T Jr, Helman L J, Ahn T G (1990) : Molecular cloning of β_3 subunit, a third form of the G protein β -subunit polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* **87** : 2329-2333.
- 19) von Weizsäcker E, Strathmann M P, and Simon M I (1992) : Diversity among the beta subunits of heterotrimeric GTP-binding proteins :Characterization of a novel beta-subunit cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* **183** : 350-356.
- 20) Amatruda T T III, Gautam N, Fong H K W, Northup J K, Simon M I (1988) : The 35- and 36-kDa β Subunits of GTP-binding Regulatory Proteins Are products of Separate Genes. *J Biol Chem* **263** : 5008-5011.
- 21) Gao B, Mumby S, Gilman A G (1987) : The G protein β_2 Complementary DNA Encodes the β_{35} Subunit. *J Biol Chem* **262**: 17254-17257.
- 22) Lee R H, Lieberman B S, Yamane H K, Bok D, Fung B K-K (1992) : A

- third form of the G protein β subunit: Immunochemical identification and localization to cone photoreceptors. *J Biol Chem* **267** : 24776-24781.
- 23) Fung B K-K, Lieberman B S, Lee R H, (1992) : A third form of the G protein β Subunit: Purification and biochemical properties. *J Biol Chem* **267** : 24782-24788.
- 24) Kleuss C, Scherübl H, Hescheler J, Schultz G, Wittig B (1992) : Different β -subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors. *Nature* **358** : 424-426.
- 25) 中川八郎(1985) : 生物化学実験のてびき. 1 生物資料調製法, 泉美治, 中川八郎, 三輪谷俊夫編, 化学同人, 京都, 57-75 頁.
- 26) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J (1951) : Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* **193** : 265-275.
- 27) Chomczynski P, Sacchi N (1987) : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162** : 156-159 .
- 28) Feinberg A P, Vogelstein B (1983) : A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132** :6-13.
- 29) Laemmli VK (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680-685.
- 30) Hurley JB, Fong HK, Teplow DB, Dreyer WJ, Simon MI (1984) : Isolation and characterization of a cDNA clone for the γ subunit of bovine retinal transducin. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 6948-6952.
- 31) Robishaw JD, Kalman VK, Moomaw CR, Slaughter CA (1989) : Existence of two γ subunits of the G proteins in brain. *J Biol Chem* **264** : 15758-15761
- 32) Gautam N, Northup J, Tamir H, Simon MI (1990) : G protein diversity is increased by associations with a variety of γ subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* **87** : 7973-7977.
- 33) Fisher KJ, Aronson NN (1992) : Characterization of the cDNA and Genomic Sequence of a G protein γ Subunit(γ_5). *Mol Cell Biol* **12** : 1585-1591.
- 34) Cali JJ, Balcueva EA, Rybalkin I, Robishaw JD (1992) : Selective tissue Distribution of G Protein γ Subunits, Including a New Form of the γ Subunits Identified by cDNA Cloning. *J Biol Chem* **267** : 24023-24027.
- 35) Hekman M, Holzhöfer A, Gierschik P, Im M-J, Jakobs K-H, Pfeuffer T, Helmreich EJM (1987) : Regulation of signal transfer from β_1 -adrenoceptor to adenylate cyclase by $\beta\gamma$ subunits in a reconstituted system. *Eur J Biochem* **169** : 431-439.
- 36) Simonds WF, Butrynski JE, Gautam N, Unson CG, Spiegel AM (1991) : G-protein $\beta\gamma$ Dimers. *J Biol Chem* **266** : 5363-5366.
- 37) Cerione RA, Gierschik P, Staniszewski C, Benovic JL, Codina J, Somers R, Birnbaumer L, Spiegel AM, Lefkowitz RJ, Caron MG (1987) : Functional Differences in the $\beta\gamma$ complexes of Transducin and Inhibitory Guanine Nucleotide Regulatory protein. *Biochemistry* **26** : 1485-1491.
- 38) Fawzi AB, Fay DS, Murphy EA, Tamir H, Erdos JJ, Northup JK (1991) : Rhodopsin and the Retinal G-protein Distinguish Among G-protein $\beta\gamma$ Subunits Forms. *J Biol Chem* **266** : 12194-12200.
- 39) Kanaho Y, Tsai S-C, Adamik R, Hewlett EL, Moss J, Vaughan M (1984) : Rhodopsin-enhanced GTPase Activity of the Inhibitory GTP binding Protein of adenylate Cyclase. *J Biol Chem* **259** :7378-7381.
- 40) Clapham DE, Neer EJ (1993) : New roles for G-protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365** : 403-406.
- 41) Iñiguez-Lluhi JA, Simon MI, Robishaw JD, Gilman AG (1992) : G protein $\beta\gamma$ Subunits Synthesized in Sf9 Cells. *J Biol Chem* **267** : 23409-23417.
- 42) Tamir H, Fawzi AB, Tamir A, Evans T, Northup JK (1991) : G-protein $\beta\gamma$ Forms : Identity of β and Diversity of γ Subunits. *Biochemistry* **30** : 3929-3936.
- 43) Peng YW, Robishaw JD, Levine MA, Yau K-W (1992) : Retinal rods and cones have distinct G protein β and γ subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* **89** : 10882-10886.
- 44) Stow JL, de Almeida JB, Narula N, Holtzman EJ, Ercolani L, Ausiello DA (1991) : A Heterotrimeric G Protein, $G\alpha_{i-3}$, on Golgi Membranes

Regulates the Secretion of a Heparan Sulfate Proteoglycan in LLC-PK1 Epithelial Cells. *J Cell Biol* **114** : 1113-1124.

- 45) Kuo C-H, Taira E, Takaha N, Sohma H, Akino T, Fukada Y, Sanada K, Miki N (1993) : Purification and characterization of MEKA-like proteins in liver : Association of a 94 protein with $\beta\gamma$ subunits of G-proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **191**: 1097-1104.
- 46) Hall A (1990) : The Cellular Functions of Small GTP-Binding Proteins. *Science* **249** : 635
- 47) Craig CM, Erikson R L (1993) : Extracellular Signals and Reversible Protein Phosphorylation: What to Mek of It All. *Cell* **74** : 215-217.

Specific expression and distribution of the isoforms of GTP binding protein β subunits in Hearts

Shinnosuke Muramoto

Department of Cardiovascular Medicine
Hokkaido University School of Medicine
Sapporo 060, Japan

key words

GTP binding protein, β subunit, Subcellular distribution

A growing body of evidence now supports the idea that free $\beta\gamma$ subunits of GTP binding proteins (G proteins) can themselves interact functionally with effector proteins. Recent results suggest that β subunits might be playing a key role to specify the receptor-effector coupling in various transmembrane signaling systems. The purpose of this study is to examine the expression level and distribution of G protein β subunits in rat hearts.

Methods : Brain and ventricle of WKY rats were used to examine the expression of three different isoforms of β subunits in mRNA and protein level by means of Northern blot and Western blot analysis, respectively.

Results : $\beta 3$ mRNA was expressed significantly more in ventricles than in brains. This result was supported by Western blot analysis showing that $\beta 3$ was expressed more in ventricles. For all three isoforms ($\beta 1, \beta 2$ and $\beta 3$), the majority of β subunits expressed in rat hearts were detected in cytosolic fractions. An ultrafiltration and subsequent Western blot analysis revealed that the β subunits in ventricular cytosolic fractions had molecular mass greater than 100,000 dalton.

Conclusions : In this study, tissue-specific expression of β subunit isoforms was revealed in rat hearts.

心臓におけるGTP結合蛋白質 β サブユニット 各アイソフォームの特異的な発現と局在

村元 信之介

北海道大学医学部循環器内科

近年、様々な知見の集積より、G蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニット自体がエフェクターに直接作用することが示されている。また、 β サブユニットが細胞膜を介する情報伝達系において受容体とエフェクターの連関の特異性を決める可能性が示された。よって本研究では、ラット心筋を用い、心臓におけるG蛋白質 β サブユニットの発現と分布の特異性を調べた。

方法：Wistar Kyotoラットの脳と心臓を用い、mRNAおよび蛋白レベルにおける β サブユニット、各アイソフォームの発現を、それぞれノザンブロット法、ウエスタンブロット法にて調べた。

結果：心室における β_3 のmRNAの発現は脳と比較して有意に強かった。ウエスタンブロット法による蛋白レベルの解析においても、 β_3 は心臓においてより強く発現していた。心臓において β_1 、 β_2 、 β_3 すべてのアイソフォームは、膜分画より細胞質分画に多量に存在していた。また心臓の細胞質分画を遠心濾過（分画分子量10万）にて再分画後、ウエスタンブロット法にて解析したところ、 β サブユニットは10万ダルトン以上の形態で細胞質に存在することが示された。

結語：本研究にて心臓における β サブユニットアイソフォームに、臓器特異的な発現があることを示した。

Fig. 1. Northern blot analysis of β_1 , β_2 , and β_3 mRNA in bovine and rat tissues.

Total mRNAs (30 μ g) from bovine and rat tissues were resolved on a 1.2% agarose-formaldehyde gel, blotted onto a nylon membrane, and hybridized with radiolabelled probes complementary to the mRNAs encoding β_1 , β_2 , and β_3 , respectively. The tissues are as follows: R, bovine retina; B, rat brain; H, rat ventricle; A, rat atrium; Ao, rat aorta. Blots were exposed to x-ray films for 10-14 days. RNA lengths were determined relative to RNA size markers, as shown to the right of the figure. All the bands of 28S rRNAs on the gel stained by ethidium bromide were almost equal, as shown at the bottom line of the figure.

Fig. 2. Expression of β_1 , β_2 , and β_3 mRNAs in rat tissues.

Northern blots of total RNA isolated from rat brain and ventricle were probed as described. Values obtained from FUJIX imaging scan of the probed membrane, as described under "Method", were analysed. β_3 mRNA is expressed significantly more in ventricle than in brain ($p < 0.01$). Values are described as mean \pm s.d. ($n=5$). A.U.: arbitrary unit.

Fig. 3. Western blot analysis of membrane and cytosolic proteins resolved on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Samples were prepared as described under "Method", subjected to SDS-PAGE, and transferred to PVDF membrane. 50 μ g of each protein was loaded except for Tm, 50ng. The blots were incubated with the indicated primary antisera (diluted 1:250) in TTBS solution as described under "Method", with 0.1mCi/ml of 125 I-labeled Protein A in the same solution. Each blot was exposed to x-ray film with intensifying screen for 2 days at -80 $^{\circ}$ C. Numbers to the right of the figure indicate the molecular masses (kDa). The letters at the top refer to sample preparations: Gt, purified bovine transducin provided by Dr.A.M.Spiegel (NIH,USA); Rm, bovine retina

membrane ; Rc, bovine retina cytosol ; Bm, rat brain membrane ; Bc, rat brain cytosol ; Hm, rat ventricular membrane ; Hc, rat ventricular cytosol.

Fig. 4. **Quantitative Western blot analysis in bovine and rat tissues.**

Total protein expression of each β subunit (membrane and cytosolic fraction were combined) was compared in three tissues by using Fujix imaging system. Values obtained from $\beta 3$ is expressed equally or more in ventricle than in brain. Values are described as mean \pm s.d.. A.U. means arbitrary unit.

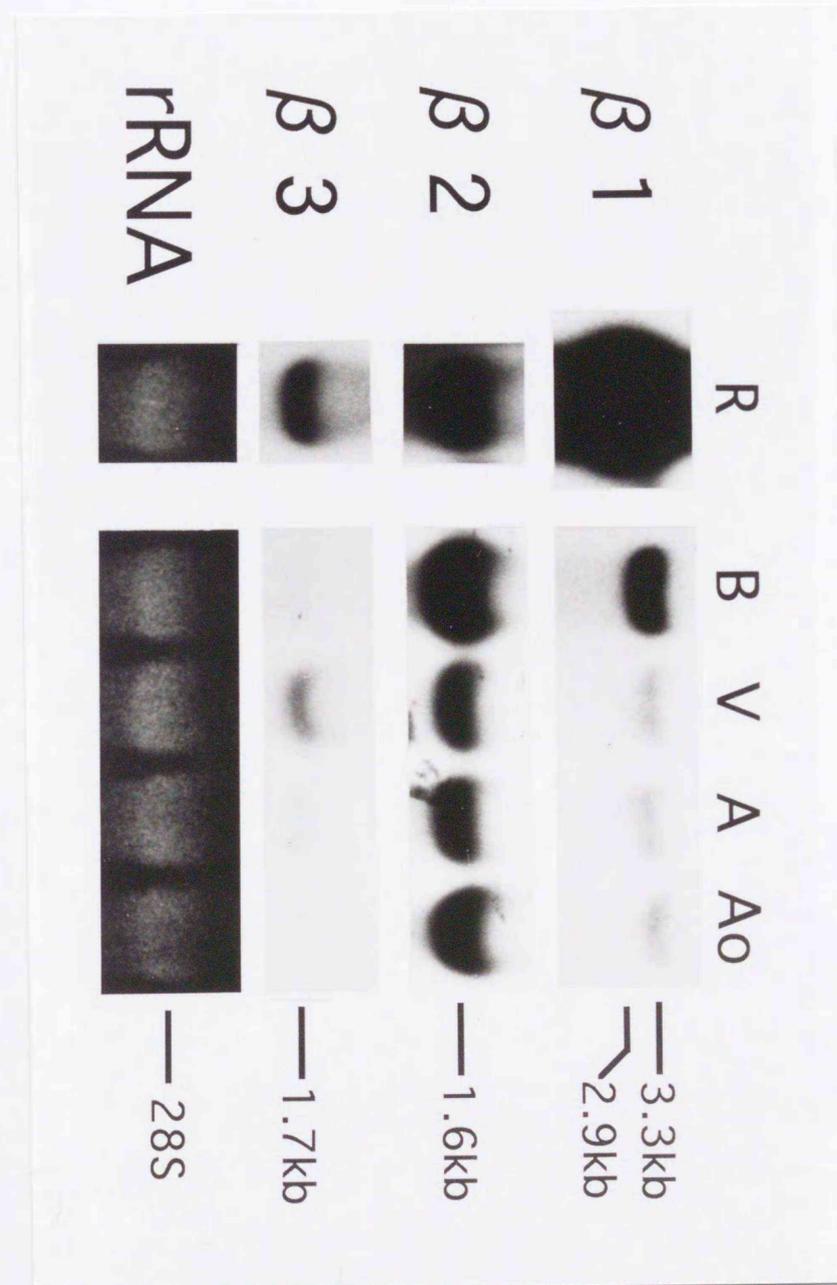
Fig.5. **Subcellular distribution of G protein β subunits.**

This figure shows the distribution ratios of G protein β subunit : retina, brain and heart. Ratio was calculated in cytosol and membrane, respectively, and expressed as percent of total amount. In brain tissue, ratios of $\beta 1$ and $\beta 2$ subunits are higher in membrane than in cytosol, and $\beta 3$ subunit is higher in cytosol than in membrane (distribution ratio in membrane fractions : $\beta 1$, $77 \pm 3.6\%$; $\beta 2$, $81 \pm 0.5\%$; $\beta 3$, $27 \pm 10.8\%$). On the other hand, in ventricle, all subunits exist more in cytosol than in membrane (distribution ratio in membrane : $\beta 1$, $12 \pm 3.7\%$; $\beta 2$, $34 \pm 1.0\%$; $\beta 3$, $12 \pm 6.0\%$).

Fig. 6. **Size of β subunits in cytosolic fractions.**

150 μ g of ventricular cytosolic fraction was filtrated through Centricon 100 (cut-off m.w. : 100,000 dalton). Entire eluate and retained fractions were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis. Both anti $\beta 1$ and anti $\beta 3$ antiserum detected specific band only in retained fractions indicating that β subunits in ventricular cytosolic fractions are composing complex with molecular mass greater than 100,000.

Fig. 1 林元信之介



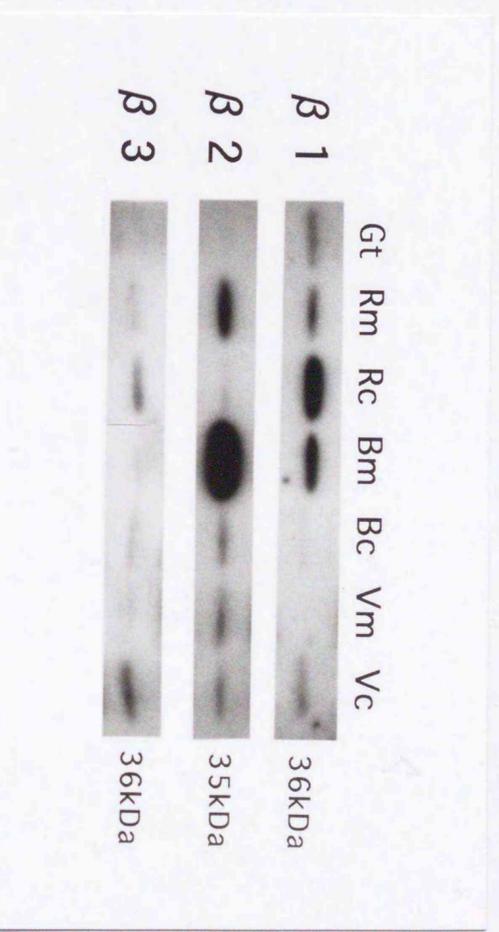


Fig 3 神经元信号

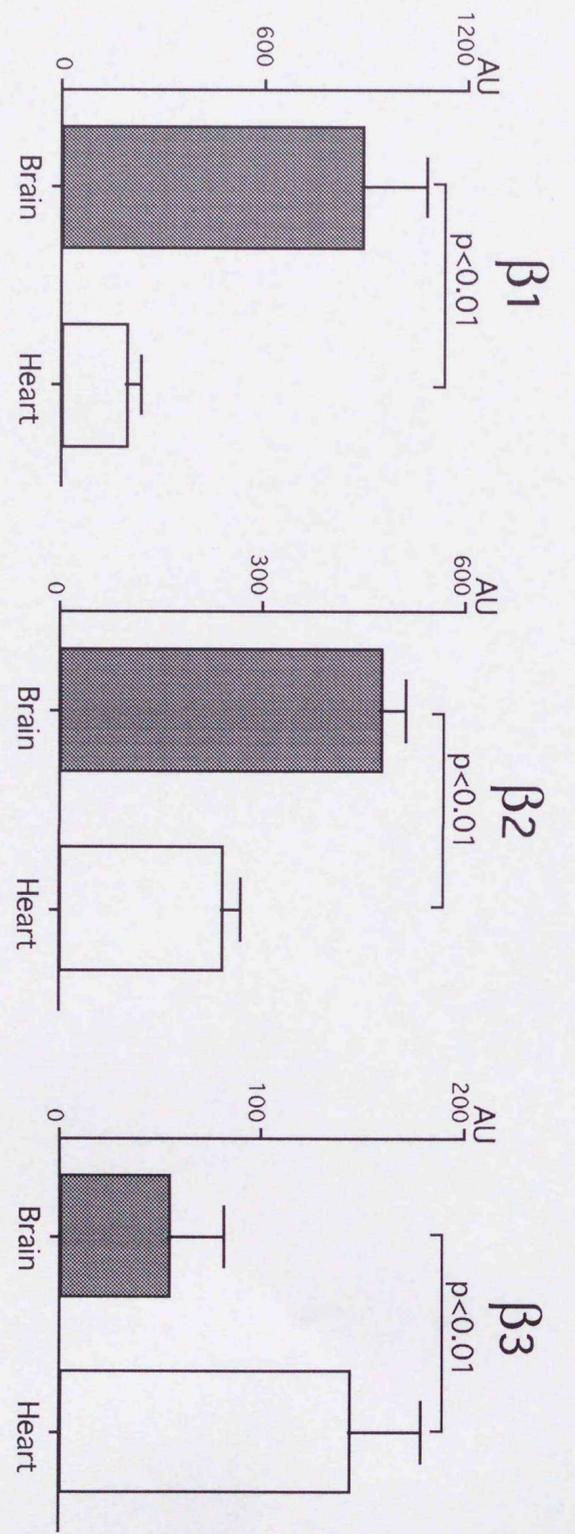


Fig 2 神经元信号

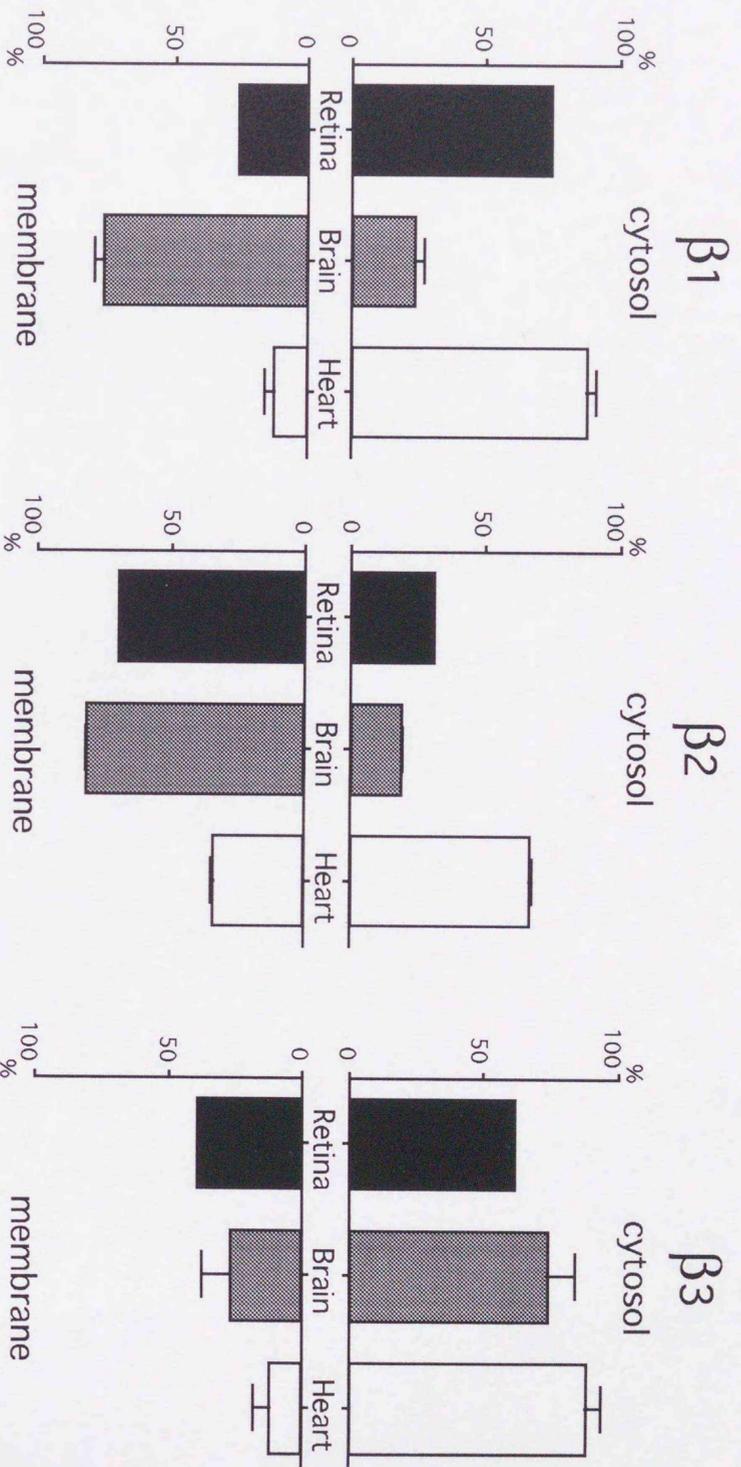


Fig 5 木元信之介



Fig 4 木元信之介

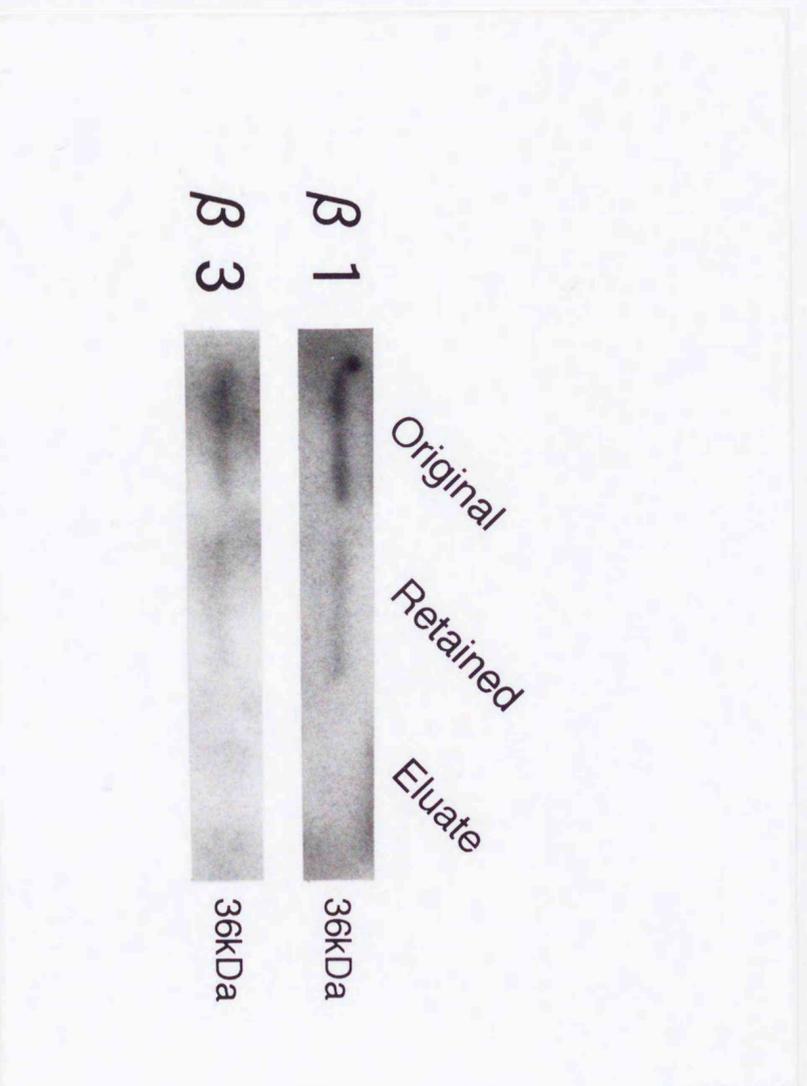


Fig 6 补充信价

