



Two Functionally Different Domains of Rabphilin-3A, Rab 3A p25/smg p25A-binding and Phospholipid- and Ca²⁺-binding Domains

山口，務

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1995-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1359

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001359>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	山 口 務	(兵庫県)
博士の専攻 分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博い第942号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成7年3月31日	
学位論文題目	Two Functionally Different Domains of Rabphilin-3A, Rab 3A p25/smug p25A-binding and Phospholipid- and Ca^{2+} -binding Domains (Rabphilin-3AにはRab 3Aが結合するドメインと Ca^{2+} およびリン脂質が結合するドメインの2つの機能的に異なるドメインが存在する)	
審査委員	主査 教授 山村博平 教授 岡田昌義 教授 横山光宏	

論文内容の要旨

*Rab3A*は*Ras*類似低分子量GTP結合蛋白質のサブファミリーの1つである*Rab*ファミリーに属しており、特に神経伝達物質の放出反応に関与していることが明らかになりつつある。*Rab3A*にはGDP結合型の不活性型(GDP-Rab3A)とGTP結合型の活性型(GTP-Rab3A)があり、GDP-Rab3Aが標的蛋白質に作用してその機能を遂行すると考えられている。また、*Rab3A*のGDP結合型からGTP結合型への変換を抑制する蛋白質としてGDP解離抑制物質(*RabGDI*)が同定されており、さらにこの*RabGDI*はGDP/GTP変換反応を抑制するだけでなく、GDP-Rab3Aの細胞膜と細胞質の間のトランスロケーションを制御していることも見出されている。

ところで、*Rab3A*の標的蛋白質については長らく不明であった。われわれは、ウシ大脳膜画分より*Rab3A*の標的蛋白質を精製することに成功し、そのcDNAをクローニングして*Rabphilin-3A*と命名している。*Rabphilin-3A*は704個のアミノ酸からなる分子量77,976のシングルポリペプチドで、シナプス小胞に局在している。*Rabphilin-3A*のC末端側には、シナプトダグミンと同様に、CキナーゼのC₂領域と相同性の高い配列が2個存在している。シナプトタグミンはシナプス小胞に存在する蛋白質で、C₂領域に Ca^{2+} とリン脂質が結合することから、プレシナプスにおいて Ca^{2+} センサーとして働いていると考えられている。同様に、*Rabphilin-3A*もプレシナプスにおいて、 Ca^{2+} センサーとして働いている可能性がある。今回、*Rabphilin-3A*の神経伝達物質の放出反応における役割を明らかにするために、*Rabphilin-3A*の機能ドメインの解析を行った。

[方法]

1. *Rabphilin-3A*の発現及び精製

Rabphilin-3A、N末端フラグメント(1-280アミノ酸)及びC末端フラグメント(281-704アミノ酸)をそれぞれpGEX-2Tのプラスミドに組み込み、大腸菌にトランスフェクションして発現させた。蛋白質の精製はグルタチオンーセファロース4Bカラムを用いて行った。また、*Rabphilin-3A*のN末端側の18個のアミノ酸およびC末端側の16個のアミノ酸のペプチドを合成し、これに対するポリクローナル抗体を作成した。この抗体を用いて、*Rabphilin-3A*の検出をウエスタンプロット法にて行っ

た。

2. Rabphilin-3Aのリン脂質への結合

ホスファチジルセリンおよびホスファチジルコリンよりなるリポソームを作成し、これに対するRabphilin-3Aの結合脳を調べた。

3. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ のRabphilin-3Aの結合

Rabphilin-3A、N末端フラグメントおよびC末端フラグメントをあらかじめグルタチオンーセファロース4Bに結合させておき、これに対する $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の結合脳を調べた。

4. Rab3AのRabphilin-3Aへの結合

ショ糖密度勾配遠心法を用いてRab3AとRabphilin-3A、N末端フラグメントおよびC末端フラグメントとの結合の有無を調べた。また、Rabphilin-3A、N末端フラグメントおよびC末端フラグメントをあらかじめグルタチオンーセファロース4Bに結合させておき、これに対する [^{35}S] GTP γS -Rab3Aの結合脳を調べた。

[結果]

1. Rabphilin-3Aの大腸菌での発現および精製

Rabphilin-3A、N末端フラグメントおよびC末端フラグメントは、それぞれSDS-PAGE上、分子量約105,000、58,000、74,000であった。

2. Rabphilin-3Aのリン脂質への結合

Rabphilin-3Aと、C末端フラグメントは、ホスファチジルセリンのみからなるリポソームに Ca^{2+} 依存性に結合したが、N末端フラグメントは結合しなかった。 Ca^{2+} 以外の2価イオンの存在下ではRabphilin-3Aと、C末端フラグメントはこのリポソームに結合しなかった。またGTP γS -Rab3Aは、この結合に影響をおよぼさなかった。一方、リポソーム中のホスファチジルコリンの割合を増加すると、Rabphilin-3Aと、C末端フラグメントの結合量は減少した。さらにホスファチジルセリンのみからなるリポソームには、Rabphilin-3A、N末端フラグメントおよびC末端フラグメントは、ほとんど結合しなかった。

3. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ のRabphilin-3Aの結合

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ はホスファチジルセリンのみからなるリポソームの存在下でRabphilin-3AおよびC末端フラグメントに結合したが、N末端フラグメントには結合しなかった。リポソーム中のリン脂質の割合をホスファチジルセリン：ホスファチジルコリン=2:1にすると、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の結合量はホスファチジルセリンのみの場合に比べて約50%になった。

4. Rab3AのRabphilin-3Aへの結合

ショ糖密度勾配遠心法では、Rab3AはRabphilin-3AとN末端フラグメントに結合したが、C末端フラグメントは結合しなかった。また、1分子のRabphilin-3AおよびN末端フラグメントに対してそれぞれ1分子の [^{35}S] GTP γS -Rab3Aが結合した。Kd値はRabphilin-3AおよびN末端フラグメントとともに180nMであった。

[考察]

本研究では、Rabphilin-3Aが、Rab3Aが結合するN末端領域と Ca^{2+} とリン脂質が結合するC₂様領域の存在するC末端領域の少なくとも2つの異なった機能領域を有していることを示した。このことから、Rabphilin-3Aが、Rab3Aの標的蛋白質であると同時に、 Ca^{2+} センサーとして神経伝達物質の放出を制御している可能性が高いと考えられる。以上の結果から、神経伝達物質の放出機構は次のように考えられる。非刺激時には、Rab3AはGDP結合型で、Rab-GDIと複合体を形成して細

胞質に存在している。何らかの機序でRab3AがRab GDIから解離すると、Rab3Aは、GDP結合型からGTP結合型に変換されてシナプス小胞に存在するRabphilin-3Aに結合し、シナプス小胞をプレシナプス膜に輸送してドッキングさせる。さらに、Rabphilin-3Aが、Rab3AのGTPase活性を促進するRab3AGAPの作用を阻害する活性(GIP)と、Rab3AのGDP/GTP変換反応を促進する活性(GEP)を有していることも見出されており、これらの活性によりRab3Aはその機能を遂行するまでGTP結合型に維持されると考えられる。シナプス小胞とプレシナプス膜との融合は、普遍的膜融合装置であるN-ethyl-maleimide sensitive fusion protein(NSF)-soluble NSF attachment protein(SNAP)-SNAP receptor(SNARE)系によって制御されており、シントタグミンはこの系を抑制していると考えられている。Rabphilin-3Aも同様この系に抑制的に働き、シントタグミンと共にシナプス小胞とプレシナプス膜との融合を抑制していると考えられる。プレシナプス膜が興奮してCa²⁺がシナプスに流入すると、Rabphilin-3AとシントタグミンのNSF-SNAP-SNARE系に対する抑制が解除され、シナプス小胞とプレシナプス膜の融合が起きて神経伝達物質が放出される。その後、GTPase活性によりGDP結合型からGTP結合型に変換されたRab3Aは、Rabphilin-3Aから解離してRab GDIの作用で再び細胞質に移動する。このようにRab3AはRabphilin-3Aと共に役して、シナプス小胞のプレシナプス膜へのターゲッティングとドッキングを制御していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Rab3AはRas類似低分子量GTP結合蛋白質のサブファミリーの1つであるRabファミリーに属しており、特に神経伝達物質の放出反応に関与していることが明らかになりつつある。Rab3AにはGDP結合型の不活性型とGTP結合型の活性型があり、GTP結合型のRab3Aが標的蛋白質に作用してその機能を遂行すると考えられている。また、Rab3AのGDP結合型からGTP結合型への変換を抑制する蛋白質としてGDP解離抑制物質(Rab GDI)が同定されており、さらにこのRab GDIはGDP/GTP変換反応を抑制するだけでなく、GDP-Rab3Aの細胞膜と細胞質の間のトランスロケーションを制御していることも見出されている。

最近、本研究者を含むグループによってRab3Aの標的蛋白質がウシ大脳膜画分より精製され、その一次構造が決定されてRabphilin-3Aと命名されている。Rabphilin-3Aは704個のアミノ酸からなる分子量77,976のシングルポリペプチドで、シナプス小胞に局在している。Rabphilin-3AのC末端側には、CキナーゼのC₂領域と相同性の高い配列が2個存在している。本研究では、大腸菌にてRabphilin-3A、およびそのN末端フラグメントとC末端フラグメントを発現させて精製し、これら用いてRabphilin-3Aの機能領域の解析を行った。ショ糖密度勾配遠心法でRab3Aとの結合を調べたところ、Rab3AはRabphilin-3AとN末端フラグメントに結合したが、C末端フラグメントには結合しなかった。次にリポソームをもちいてリン脂質との結合を調べた。ホスファチジルセリンよりもリポソームにRabphilin-3AとC末端フラグメントが結合したが、N末端フラグメントは結合しなかった。一方、ホスファシジルコリンのみからなるリポソームにはRabphilin-3A、N末端フラグメントおよびC末端フラグメントはほとんど結合しなかった。またホスファチジルセリンのみからなるリポソームの存在下で、⁴⁵Ca²⁺はRabphilin-3AとC末端フラグメントに結合したが、N末端フラグメントには結合しなかった。これらの結果から、Rabphilin-3AにはRab3Aが結合するN末端領域と、リン脂質とCa²⁺が結合するC₂様領域の存在するC末端領域の少なくとも2つの異なった機能領域が存

在することが示された。以上のことと総合して、神経伝達物質の放出機構は次のように考えられる。非刺激時には、*Rab3A*はGDP結合型で、*RabGDI*と複合体を形成して細胞質に存在している。何らかの機序で*Rab3A*が*RabGDI*から解離すると、*Rab3A*は、GDP結合型からGTP結合型に変換されてシナプス小胞に存在する*Rabphilin-3A*に結合し、シナプス小胞をプレシナプス膜に輸送してドッキングさせる。プレシナプス膜が興奮してCa²⁺がシナプスに流入すると、シナプス小胞とプレシナプス膜の融合が起きて神経伝達物質が放出される。その後、GTPase活性によりGDP結合型からGTP結合型に変換された*Rab3A*は、*Rabphilin-3A*から解離して*RabGDI*の作用で再び細胞質に移動する。このように*Rabphilin-3A*は*Rab3A*の標的蛋白質であると同時に、カルシウムセンサーとして働き*Rab3A*と共に役割を果たすで神経伝達物質の放出を制御していると考えられる。

本研究は*Rabphilin-3A*の機能領域の解析を、独創的な手法を用いて研究したものであり、*Rab3A*とその標的蛋白質である*Rabphilin-3A*の神経伝達物質の放出機構における役割の解明につながる重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究は、博士（医学）学位を得る資格があると認める。