



# Two Functionally Different Domains of Rabphilin-3A, Rab 3A p25/smg p25A-binding and Phospholipid- and $Ca^{2+}$ -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）	やまぐち つとむ 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 Defferent Domains of Rabphilin-3A, <i>Rab 3A</i> p25/ <i>smg</i> p25A-binding and Phospholipid- and $\text{Ca}^{2+}$ -binding Domains (Rabphilin-3Aには <i>Rab 3A</i> が結合するドメインと $\text{Ca}^{2+}$ 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C<sub>2</sub>領域と相同性の高い配列が2個存在している。シナプトダグミンはシナプス小胞に存在する蛋白質で、C<sub>2</sub>領域に $\text{Ca}^{2+}$ とリン脂質が結合することから、プレシナプスにおいて $\text{Ca}^{2+}$ 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、 $\text{Ca}^{2+}$ 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ブロット法にて行っ

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-S-セファロース 4 Bに結合させておき、これに対する $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の結合を調べた。

## 4. Rab3AのRabphilin-3Aへの結合

シヨ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-S-セファロース 4 Bに結合させておき、これに対する $[^{35}\text{S}] \text{GTP} \gamma\text{S} - \text{Rab3A}$ の結合を調べた。

### 【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 $\text{Ca}^{2+}$ 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。 $\text{Ca}^{2+}$ 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 $\text{GTP} \gamma\text{S} - \text{Rab3A}$ 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

シヨ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 $[^{35}\text{S}] \text{GTP} \gamma\text{S} - \text{Rab3A}$ が結合した。K<sub>d</sub>値はRabphilin-3AおよびN末端フラグメントにともに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 $\text{Ca}^{2+}$ とリン脂質が結合するC<sub>2</sub>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、 $\text{Ca}^{2+}$ 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*Rab3A GAP*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、シンプ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、シンプ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 $Ca^{2+}$ がシナプスに流入すると、Rabphilin-3Aとシンプトタグミンの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と共役して、シナプス小胞のプレシナプス膜へのターゲ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C<sub>2</sub>領域と相同生の高い配列が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、これらを用いて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。次にリボ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なるリボソームに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、ホスファチジルコリンのみからなるリボソームには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ボソームの存在下で、 $^{45}Ca^{2+}$ 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 $Ca^{2+}$ が結合するC<sub>2</sub>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。以上のことを総合して、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 $\text{Ca}^{2+}$ 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*と共役してプレシナプス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。