



LOCALIZATION OF Rabphilin-3A, A PUTATIVE TARGET PROTEIN FOR Rab 3A, AT THE SITES OF Ca^{2+} -DEPENDENT EXOCYTOSIS IN PC12 CELLS

和田, 謙

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1995-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1360

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001360>

※ 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)	和田 謙 (大阪府)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第943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	LOCALIZATION OF Rabphilin-3A, A PUTATIVE TARGET PROTEIN FOR <i>Rab</i> 3A, AT THE SITES OF Ca^{2+} -DEPENDENT EXOCYTOSIS IN PC12 CELLS (PC12細胞における <i>Rab</i> 3A標的蛋白質Rabphilin-3Aと Ca^{2+} 依存性エクソサイトーシス部位の局在解析)
審査委員	主査 教授 山村 博 平 教授 春日 雅 人 教授 奥村 勝 彦

論文内容の要旨

(序文)

*Rab*ファミリーは*Ras*類似低分子量GTP結合蛋白質(G蛋白質)スーパーファミリーの1つである。現在までに、*Rab*ファミリーはエンドサイトーシスやエクソサイトーシス、トランスサイトーシスなどの細胞内小胞輸送を制御していることが明らかになっている。そのなかで、*Rab*3A/*Smg*25Aは神経系をはじめとする制限分泌の制御に関与していることが明らかになりつつある。神経組織では*Rab*3Aはプレシナプスに存在し、特にシナプス小胞上に多く存在している。これまでの研究から、*Rab*3Aはプレシナプスからの神経伝達物質の放出反応の制御に関与していると推定されている。

*Rab*3AにはGDP結合型の不活性型とGTP結合型の活性型が存在し、GTP結合型*Rab*3Aが標的蛋白質と結合してその機能を果たすと考えられている。最近、私共はウシ大脳膜画分よりGTP結合型*Rab*3Aと特異的に結合する標的蛋白質を見出して精製し、そのcDNAをクローニングして一次構造を決定し、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の単一ポリペプチドで、Cキナーゼやシナプトタグミン、ホスホリパーゼA₂のC₂領域と相同性の高い配列がC末端側に2回繰り返して存在している。Cキナーゼやシナプトタグミンは、このC₂領域を介して Ca^{2+} 依存性にリン脂質と結合することが知られている。最近、私共はRabphilin-3AのC末端側領域が Ca^{2+} 依存性に膜リン脂質と結合し、またN末端側領域が*Rab*3Aと結合することを確認している。したがって、*Rab*3AはRabphilin-3Aと Ca^{2+} シグナルを介して神経伝達物質の放出反応の制御に関与している可能性が高い。

PC12細胞(ラット褐色細胞腫細胞)は、神経伝達物質の放出反応に類似したホルモン分泌反応を行う。PC12細胞では小胞膜蛋白質であるドパミンβ-ヒドロキシラーゼ(DβH)が高K⁺刺激による脱分極性の Ca^{2+} 依存性エクソサイトーシスにともなって細胞表面に露出することから、DβH細胞外ドメインに対する抗体によって Ca^{2+} 依存性エクソサイトーシスを測定することができる。そこで、本研究ではPC12細胞を高K⁺刺激した時、新たに細胞表面に出現するDβHを観察することによりRabphilin-3Aと*Rab*3Aが Ca^{2+} 依存性エクソサイトーシス部位に多く存在することを示した。

(実験方法)

1) 材料

Rabphilin-3AのN末端フラグメント(1-280 アミノ酸)を用いて得られた免疫ウサギ血清をアフィニティカラムにて精製し、抗Rabphilin-3Aポリクローナル抗体を作製した。ラミネンコートした35 mmディッシュを用いてP C12細胞を培養して分化させた。

2) 分化P C12細胞におけるRabphilin-3AとRab3Aの局在

B t₂c AMPまたはNGFにて分化させたP C12細胞を2%パラホルムアルデヒドにて固定して0.05%Triton X-100にて処理後、1次抗体として抗Rabphilin-3Aポリクローナル抗体と抗Rab3Aモノクローナル抗体(mAb SG-11-7)を、2次抗体としてテキサスレッド標識抗ウサギIgG抗体とフルオレセイン標識抗マウスIgG抗体を用いて二重免疫蛍光染色を行った。免疫蛍光染色後の細胞は共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

3) Ca²⁺依存性エクソサイトーシス部位の同定

分化P C12細胞をCa²⁺の存在下で高K⁺(60mM)刺激により37°C 2分間脱分極させて4%パラホルムアルデヒドにて固定後、細胞表面に露出したDβHを抗DβHモノクローナル抗体とフルオレセイン標識抗マウスIgG抗体で免疫蛍光染色を行った。次に、細胞を0.05%Triton X-100にて処理し、抗Rabphilin-3Aポリクローナル抗体とテキサスレッド標識抗ウサギIgG抗体で免疫蛍光染色を行った。免疫蛍光染色後の細胞は共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

(実験結果)

1) P C12細胞におけるRabphilin-3AおよびRab3Aの発現

未分化P C12細胞とB t₂c AMPまたはNGFにて分化させたP C12細胞におけるRabphilin-3AとRab3Aの発現をウェスタンブロッティング法にて調べた。分子量約80KDの位置にRabphilin-3Aを示すバンドが認められたが、未分化P C12細胞と分化P C12細胞との間には発現量の差は認められなかった。Rab3Aの発現量に関してはB t₂c AMPまたはNGFによる分化により軽度の増加が認められた。

2) 分化P C12細胞におけるRabphilin-3AとRab3Aの局在

B t₂c AMPにて分化させたP C12細胞ではRabphilin-3Aの免疫反応が胞体および神経突起の先端に強く認められた。先端に強いRabphilin-3Aの免疫反応を有する神経突起は大部分が長さ50 μm以上でまっすぐに伸長していた。また神経突起のシャフト部分のRabphilin-3A免疫反応は弱かった。一方、Rab3Aの免疫反応は胞体および神経突起の先端に強く認められたが、神経突起のシャフト部分の免疫反応は中等度であった。先端に強いRab3Aの免疫反応を有する神経突起はすべて強いRabphilin-3A免疫反応を有していたが、先端のRab3A免疫反応が弱い、または免疫反応を有しない神経突起はRabphilin-3A免疫反応を示さなかった。NGFにて分化させたP C12細胞においても同様の結果が得られた。

3) 分化P C12細胞におけるCa²⁺依存性エクソサイトーシス部位とRabphilin-3Aの局在比較

高K⁺刺激前にはB t₂c AMPにて分化させたP C12細胞では、DβH免疫反応は全く認められなかったが、胞体および長さが50 μm以上でまっすぐに伸長している神経突起の先端には、強いRabphilin-3Aの免疫反応が認められた。高K⁺刺激後には強いDβH免疫反応が主に神経突起の先端表面に出現した。また高K⁺刺激前後でRabphilin-3A免疫反応の細胞内分布に変化は認められなかった。先端に強いRabphilin-3A免疫反応を有する神経突起は、すべて高K⁺刺激により強いDβH免疫反応が出現した。しかし、先端にRabphilin-3A免疫反応をほとんど有しない神経突起は大部分が短く湾

曲しており、高 K^+ 刺激後も全く細胞表面にD β H免疫反応を示さなかった。NGFにて分化させたPC12細胞においても同様の結果が得られた。

(考察)

本研究では、分化PC12細胞においてRabphilin-3Aが Ca^{2+} 依存性にエクソサイトーシスを行っている神経突起先端部にRab3Aと共存していることを示した。このことから、Rab3Aの標的蛋白質であるRabphilin-3AがRab3Aと同様に神経伝達物質の放出機構に関与していると考えられる。Rabphilin-3Aが多く存在する神経突起先端部は成長円錐と呼ばれ、突起伸長、標的細胞識別、エンドサイトーシスやエクソサイトーシスなど様々な機能に関与していると考えられている。神経突起の伸長は細胞膜の伸展によって起こり、これは Ca^{2+} 依存性に細胞質内の膜コンパートメントが成長円錐の細胞膜に融合することによって行われている。今回、私共は長さが50 μ m以上でまっすぐに伸長している神経突起の先端にRabphilin-3AとRab3Aの強い免疫反応が存在していることを見出した。このことは成長円錐のなかでも細胞膜の伸展が著しく起きている成長円錐にRabphilin-3AとRab3Aが多く存在することを示唆している。以上のことより、神経終末におけるエクソサイトーシスや細胞膜の伸展による突起伸長などの Ca^{2+} 依存性膜融合においてRabphilin-3AとRab3Aが重要な役割を果たしていると考えられる。今後、Rabphilin-3AとRab3Aの神経終末における作用点の同定を進めるとともに、 Ca^{2+} 依存性膜融合におけるRabphilin-3AとRab3Aの役割の解析を進める必要があると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Ras類似低分子量GTP結合蛋白質スーパーファミリーの1つである。Rabファミリーはエンドサイトーシスやエクソサイトーシス、トランスサイトーシスなどの細胞内小胞輸送を制御していることが明らかになっている。そのなかで、Rab3A（別名Smg25A）は神経系をはじめとする制限分泌の制御に関与していることが明らかになりつつある。神経組織ではRab3Aはプレシナプスに存在し、特にシナプス小胞上に多く存在している。これまでの研究から、Rab3Aはプレシナプスからの神経伝達物質の放出反応の制御に関与していると推定されている。

Rab3AにはGDP結合型の不活性型とGTP結合型の活性型が存在し、GTP結合型Rab3Aが標的蛋白質と結合してその機能を果たすと考えられている。Rabphilin-3Aは、GTP結合型Rab3Aと選択的に結合する蛋白質として本研究を含むグループによってそのcDNAの一次構造が決定された分子量78,000の蛋白質であり、Rab3Aの標的蛋白質だと考えられている。Rabphilin-3AとRab3Aの細胞内の局在については未だ明らかではなかったが、本研究ではPC12細胞を高 K^+ 刺激したとき、新たに細胞表面に出現する小胞膜蛋白質であるドパミン β -ヒドロキシラーゼ（D β H）を観察することによりRabphilin-3AとRab3Aが Ca^{2+} 依存性エクソサイトーシス部位に多く存在することを示した。すなわち、分化PC12細胞においてRabphilin-3Aが Ca^{2+} 依存性にエクソサイトーシスを行っている神経突起先端部にRab3Aと共存していることを明らかにした。このことから、Rab3Aの標的蛋白質であるRabphilin-3AがRab3Aと同様に神経伝達物質の放出機構に関与していると考えられる。また、本研究者は長さが50 μ m以上でまっすぐに伸長している神経突起の先端にRabphilin-3AとRab3Aの抗体が強い反応を示すことを見出した。このことは神経突起先端部である成長円錐のなかでも細胞膜の伸展が著しく起きている成長円錐にRabphilin-3AとRab3Aが多く存在することを示唆している。以上のことより、神経終末におけるエクソサイトーシスや細胞膜の伸展による突起伸長などの

Ca²⁺依存性膜融合においてRabphilin-3AとRab3Aが重要な役割を果たしていると考えられる。

以上のように本研究者は、Rabphilin-3AがCa²⁺依存性にエクソサイトーシスを行っている神経突起先端部にRab3Aと共存して神経伝達物質の放出機構に関与している可能性を明らかにした。

本研究は、Rabphilin-3AとRab3Aの局在を、独創的な手法を用いて研究したものであり、従来ほとんど行われなかった低分子量GTP結合蛋白質（Rab3a）とその標的蛋白質Rabphilin-3Aの分泌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のある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）学位を得る資格があると認める。