Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Rab 3A GTPase-activating protein-inhibiting activity of Rabphilin-3A, a putative Rab3A target protein

岸田, 昭世

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1995-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1364
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001364

※ 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。

[42]

氏名・（本籍）	岸田昭世（きしだしょうせい）　（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947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	*Rab* 3A GTPase-activating protein-inhibiting activity of Rabphilin-3A, a putative *Rab*3A target protein （*Rab* 3A標的蛋白質Rabphilin-3AのGTPase-activating protein抑制活性）
審査委員	主査　教授　山村博平 教授　斎藤洋一　教授　千葉　勉

論文内容の要旨

［序文］

*Rab*3Aは低分子量G蛋白質スーパーファミリーのうち*Rab*ファミリーに属している。*Rab*ファミリーのメンバーはエクソサイトーシスやエンドサイトーシス，トランスサイトーシスなどの細胞内小胞輸送に関与していることが明らかになっている。*Rab*3Aは，神経細胞や外分泌細胞，内分泌細胞などのいわゆるregulated secretionをつかさどる細胞にのみ存在し，中でも神経細胞の前シナプス領域ではシナプス小胞に局在している。*Rab*3Aは，シナプス小胞をCa^{2+}チャンネルが集まっているactive zoneへ運搬して前シナプス膜に結合させることにより，神経伝達物質の放出を制御していると考えられている。

*Rab*3Aには，*Ras*と同じくＧＤＰ結合型の不活性型とＧＴＰ結合型の活性型があり，ＧＴＰ結合型が標的蛋白質に作用する。ＧＤＰ結合型からＧＴＰ結合型への変換はＧＤＰ／ＧＴＰ交換反応によりおこなわれる。この反応は，ＧＤＰ／ＧＴＰ exchange protein（ＧＥＰ）により制御されており，このＧＥＰには二種類あることが知られている。一つは，この反応に促進的に働く*Rab*3A guanine nucleotide releasing factor（*Rab*3A　ＧＲＦ）とMSS4，今一つは抑制的に働く*Rab*3A ＧＤＰ dissociation inhibitor（*Rab* ＧＤＩ）である。*Rab*3AのＧＤＰ結合型からＧＴＰ結合型への変換は，内在性のＧＴＰase活性によりおこなわれる。この反応は*Rab*3A ＧＴＰase activating protein（*Rab*3A ＧＡＰ）により促進される。

Rab ＧＤＩはＧＤＰ結合型*Rab*3Aと1:1のモル比で結合して*Rab*3AからのＧＤＰの解離を抑制するだけでなく，ＧＤＰ結合型*Rab*3Aを細胞膜から細胞質へ移動させる活性も持っている。最近，*Rab* ＧＤＩが*Rab*3Aのみならず他の*Rab*ファミリーのメンバーにも作用することが明らかになっている。

私共の研究室では，最近，ウシ大脳膜画分からＧＴＰ結合型*Rab*3Aと特異的に結合する蛋白質，すなわち，*Rab*3Aの標的蛋白質を同定し，Rabphilin-3Aと命名してそのcＤＮＡの一次構造を決定している。Rabphilin-3Aは，分子量約78,000の蛋白質で704アミノ酸残基から構成されており，そのカルボキシル基末端側に２個のC_2domainを持っている。C_2domainはC kinaseやsynaptotagmin,

phospholipase A_2などにも見られる構造で，Ca^{2+}やリン脂質が結合する部位として知られている。実際，Rabphilin-3Aにおいても，2個のC_2domainにCa^{2+}やリン脂質が結合する。また，Rabphilin-3Aのアミノ酸基末端側には*Rab*3Aが結合する。

ほ乳動物において*Rab*3A以外の低分子量G蛋白質の標的蛋白質はいくつか報告されているが，それらが真の標的蛋白質であるかは未だ明確ではない。*Ras* GTPase activating protein（*Ras* GAP）はGTP結合型*Ras*に作用してそのGTPase活性を亢進させることや，*Ras*のエフェクター領域のミュータントとは反応しないことから，*Ras*の標的蛋白質ではないかと考えられている。

今回，私は，*Rab*3A GAP存在下または非存在下でRabphilin-3Aが*Rab*3AのGTPase活性に及ぼす影響を測定し，Rabphilin-3Aは*Rab*3Aの内因性GTPase活性を軽度に促進する活性（GAP活性）と*Rab*3A GAPによる*Rab*3AのGTPase活性促進を著しく抑制する活性（GIP活性）を持つことを明らかにした。

［方法］

1．*Rab*3Aの調整

*Rab*3AのcDNAを発現ベクターに組み込み，大腸菌で発現させ，いくつかのカラムクロマトグラフィーを用いて*Rab*3Aの精製標品を作成し，GTPやGTPγS結合型*Rab*3Aを得た。

2．Rabphilin-3Aの調整

Rabphilin-3A全長とそのアミノ酸基末端側フラグメント（1〜280番目のアミノ酸残基）およびカルボキシル基末端側フラグメント(281〜704番目のアミノ酸残基)のcDNAをPCR法で作成してベクターに組み込み，グルタチオン S トランスフェラーゼの融合蛋白質として大腸菌で発現させ，グルタチオンアガロースカラムクロマイトグラフィーを用いて精製標品を得た。

3．*Rab*3A GAPの調整

ラット大脳細胞質画分からいくつかのカラムクロマトグラフィーを用いて部分精製した標品を*Rab*3A GAPとして用いた。

4．GTPase活性測定法

［γ^{-32}P］GTP結合型*Rab*3Aを*Rab*3A GAPの存在下または非存在下でRabphilin-3A全長またはそのアミノ酸基末端側フラグメント，カルボキシル基末端側フラグメントと共に30℃で5分間インキュベートした後，ただちに氷冷した緩衝液で希釈してニトロセルロース膜で濾過し，膜上に捕捉される［γ^{-32}P］GTP放射活性の減少をGTPase活性とした。

5．*Rab*3AのRabphilin-3Aの結合能判定法

［^{35}S］GTPγS結合型*Rab*3AをRabphilin-3A全長またはそのアミノ酸基末端側フラグメント，カルボキシル基末端側フラグメントと共に30℃で5分間インキュベートした後，グルタチオンアガロースビーズを加えて4℃で2時間震盪し，グルタチオンアガロースビーズと結合した［^{35}S］GTPγS放射活性を測定して*Rab*3AのRabphilin-3Aへの結合能とした。

［結果］

1．Rabphilin-3Aによる*Rab*3AのGTPase活性に対する促進作用（GAP活性）

*Rab*3Aは時間依存性に内因性のGTPase活性を示し，このGTPase活性はRabphilin-3Aを加えると軽度に亢進した。このRabphilin-3Aによる*Rab*3AのGTPase活性に対する促進作用（GAP活性）は用量依存性で，モル比活性は0.037／minであった。

2．Rabphilin-3Aによる*Rab*3A GAPの*Rab*3AGTPase促進活性に対する抑制作用（GIP活性）

Rabphilin-3Aは*Rab*3A　ＧＡＰによる*Rab*3AのＧＴＰase活性の促進を著明に抑制した。

３．Rabphilin-3Aと*Rab*3Aの結合能およびRabphilin-3AのＧＡＰ活性およびＧＩＰ活性との比較

ＧＴＰγＳ結合型*Rab*3AはRabphilin-3A全長と結合するのみならずアミノ基末端側フラグメントとも結合したが，カルボキシル基末端側フラグメントとは結合しなかった。また，Rabphilin-3Aのアミノ基末端フラグメントはRabphilin-3A全長と同濃度で同程度のＧＡＰ活性とＧＩＰ活性を示したが，カルボキシル基末端側フラグメントはＧＡＰ活性とＧＩＰ活性をまったく示さなかった。Rabphilin-3AがＧＩＰ活性を示すために必要な濃度と*Rab*3Aとの結合に必要な濃度は同程度でＧＡＰ活性を示すために必要な濃度よりも低かった。

３．Ca^{2+}とリン脂質によるRabphilin-3AのＧＡＰ活性およびＧＩＰ活性に対する影響

Rabphilin-3AのC_2domainに結合するCa^{2+}やホスファチジルセリンを加えてもRabphilin-3AのＧＡＰ活性およびＧＩＰ活性には，影響しなかった。

［考察］

今回，私は，Rabphilin-3Aが*Rab*3Aに対して弱いＧＡＰ活性と著明なＧＩＰ活性を持つことを示した。私の用いた*Rab*3A　ＧＡＰは，いまだに単一標品にまでは精製されていないが，そのＧＡＰ活性のモル比活性はRabphilin-3Aよりもはるかに強いと考えられる。Rabphilin-3AのＧＡＰ活性のモル比活性は0.037／minで，他の低分子量Ｇ蛋白質のＧＡＰである*Ras*　ＧＡＰ（約6／min）*Rho*　ＧＡＰ（約1.84／min）に比べても非常に低い。また，Rabphilin-3AがＧＡＰ活性を示すためには*Rab*3Aとの結合やＧＩＰ活性を示すためよりもはるかに高濃度のRabphilin-3Aが必要である。これらのことからRabphilin-3Aは*Rab*3Aのエフェクター領域と融合することにより単に*Rab*3Aの内因性のＧＴＰase活性に影響してＧＡＰ活性を示すだけで，実際に重要な作用は，*Rab*3A　ＧＡＰが*Rab*3Aに作用するのを阻害することによって示すＧＩＰ活性であると考えられる。すなわち，Rabphilin-3Aは*Rab*3Aの標的蛋白質として，*Rab*3Aがその機能を遂行する間*Rab*3A　ＧＡＰが作用するのを阻害して*Rab*3Aを活性型であるＧＴＰ結合型に保持する役割があると考えられる。前シナプス領域の脱分極により細胞内にCa^{2+}が流入するとなんらかのシグナルが*Rab*3AまたはRabphilin-3Aに作用し，Rabphilin-3AのＧＩＰ活性が無くなり，ＧＴＰ結合型*Rab*3Aは*Rab*3A　ＧＡＰの作用を受けＧＴＰ結合型*Rab*3Aに変換される。その後ＧＴＰ結合型*Rab*3AはRabphilin-3Aから解離し，*Rab*ＧＤＩと複合体を作り細胞膜から細胞質へと移動すると考えられる。

Rabphilin-3Aは*Rab*3Aと結合するアミノ基末端側フラグメントとCa^{2+}やリン脂質と結合するカルボキシル基末端側フラグメントの２つの異なった機能ドメインを持っている。実際，アミノ基末端側フラグメントはRabphilin-3Aとは同程度の弱いＧＡＰ活性と著明なＧＩＰ活性を示すが，これらの作用はCa^{2+}やホスファチジルセリンによる影響を受けない。また，*Rab*3AはRabphilin-3AのCa^{2+}に対する親和性に影響しない。Rabphilin-3Aのカルボキシル基末端側フラグメントは神経伝達物質の放出機構においてCa^{2+}センサーとして働く可態性があるが，現在のところこの領域へCa^{2+}が結合する意味ははっきりしていない。今後，Rabphilin-3Aと*Rab*3AやCa^{2+}，リン脂質との相互作用を解明するためにさらに研究が必要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は，低分子量ＧＴＰ結合蛋白質*Rab*3Aとその標的蛋白質Rabphilin-3Aの相互作用に関するものである。*Rab*3Aは低分子量Ｇ蛋白質スーパーファミリーのうち*Rab*ファミリーに属している。

*Rab*ファミリーの蛋白質はエクソサイトーシスやエンドサイトーシス，トランスサイトーシスなどの細胞内小胞輸送に関与していることが明らかになっている。*Rab*3Aは，分子量25,000の低分子量ＧＴＰ結合蛋白質で特に神経細胞や外分泌細胞，内分泌細胞などのいわゆる制限分泌をつかさどる細胞にのみ存在する。*Rab*3Aには，*Ras*p21と同様にＧＤＰ結合型の不活性型とＧＴＰ結合型の活性型があり，ＧＴＰ結合型が標的蛋白質に作用すると考えられている。*Rab*3AのＧＴＰ結合型からＧＤＰ結合型への変換は内在性のＧＴＰase活性によりおこなわれる。この反応は*Rab*3A ＧＴＰase activating protein（*Rab*3A ＧＡＰ）により促進される。一方，ＧＤＰ結合型からＧＴＰ結合型への変換は，ＧＤＰ／ＧＴＰ交換反応によりおこなわれる。この反応は，ＧＤＰ／ＧＴＰ exchange protein（ＧＥＰ）により制御されており，このＧＥＰには二種類ある。すなわち，一種類はこの反応に促進的に働くRabグアニンヌクレオチド放出因子（*Rab*ＧＲＦ），もう一種類は抑制的に働くRab ＧＤＰ 解離抑制蛋白質(*Rab* ＧＤＩ）である。

一方，Rabphilin-3Aは，ＧＴＰ結合型*Rab*3Aと結合する蛋白質としてウシ大脳膜画分から見いだされた分子量約78,000の蛋白質で本研究者を含むグループによってそのcDNAcの一次構造が決定されており，*Rab*3Aの標的蛋白質であると考えられている。Rabphilin-3Aは，704アミノ酸残基から構成されており，そのカルボキシル基末端側に２個のC_2領域を持っている。C_2領域はＣキナーゼやシナプトタグミン，ホスホリパーゼA_2などにも見られる構造で，Ca^{2+}やリン脂質が結合する部位として知られている。実際，Rabphilin-3Aにおいても，２個のC_2領域にCa^{2+}やリン脂質が結合する。

*Rab*3AとRabphilin-3Aの相互作用については未だ明らかではなかったが，本研究者は無生物系でRabphilin-3AがＧＴＰase活性を介して*Rab*3Aを制御していることを見いだした。すなわち，Rabphilin-3Aは軽度に*Rab*3Aの持つ内因性ＧＴＰase活性を亢進させる作用（弱いＧＡＰ活性）を持つ一方で，*Rab*3AＧＡＰの持つＧＡＰ活性を著明に抑制する作用（強いＧＩＰ活性-ＧＡＰ inhibiting protein-)をもつ事が明らかになった。また，本研究で，*Rab*3Aと結合する部位がRabphilin-3Aのアミノ酸基末端側の領域であることや，ＧＡＰ活性とＧＩＰ活性を示す領域もこの部分であることが明らかとなった。またCa^{2+}やリン脂質自体は，直接Rabphilin-3AのＧＡＰ活性とＧＩＰ活性に影響しない事も明らかとなった。

以上のように本研究者は，Rabphilin-3Aが*Rab*3AのＧＴＰase活性の制御（ＧＡＰ活性とＧＩＰ活性）を介して分泌に関与する可態性を明らかにした。

本研究は，*Rab*3Aとその標的蛋白質Rabphilin-3Aの相互作用を，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（*Rab*3A）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。