The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Annexin VI - binding Proteins in Brain
Author(s)	渡辺, 達夫
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39347
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 60 】

氏　　名	渡　辺　達　夫（わたなべ たつお）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第　11638　号
学位授与年月日	平成7年1月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Annexin VI－binding Proteins in Brain （脳におけるアネキシン VI 結合蛋白質）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 祖父江憲治 （副査） 教 授 津本 忠治　教 授 平野 俊夫

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

アネキシンVI は Ca^{2+}，燐脂質結合能を有する一群のタンパク質（アネキシンファミリー）の一つで、脳の全蛋白質の0.3％を占めるが，その機能は未だ不明である。本研究では脳におけるアネキシンVI の機能を明らかにするため，アネキシンVI 結合蛋白質検索法を開発し，アネキシンVI 結合蛋白質の同定を行うとともに，アネキシンVI 結合蛋白質とアネキシンVI の結合様式を in vitro で検討した。

[方法並びに成績]

(1) アネキシンVI 結合蛋白質の検索

脳の各分画を SDS 電気泳動後ニトロセルロース膜に転写し，^{125}I で標識したアネキシンVI と反応させることによりアネキシンVI 結合蛋白質の検出を行った。その結果，脳 whole homogenate 中に約14種類のアネキシンVI 結合蛋白質が存在することを証明した。この結果は Ca^{2+} および燐脂質依存性で，燐脂質の中でもホスファチジルセリン（PS）及びホスファチジン酸（PA）に特異的であった。さらにこの結合が過剰の未標識アネキシンVI で置換されること，高イオン強度の緩衝液で結合が抑制されること，およびグルタルアルデヒドを用いた架橋実験より，アネキシンVI とアネキシンVI 結合蛋白質間の結合は蛋白質－蛋白質間の直接的相互作用であることを明らかにした。

(2) アネキシンVIとカルスペクチン（脳スペクトリン）との結合

ラット脳の whole homogenate で見い出されたアネキシンVI 結合蛋白質のうち，分子量240kの蛋白質は細胞骨格分画に濃縮されること及び可溶化の性質から細胞膜骨格蛋白質カルスペクチンと想定されたが，実際精製蛋白質を用いた結合実験によりカルスペクチンであることを同定した。アネキシンVI はカルスペクチンの β サブユニットに結合し α サブユニットとは結合しなかった。精製カルスペクチンを用いた非変性状態下でのアネキシンVI との結合実験の結果，結合の Ca^{2+} 感受性は7.6 μM，結合定数は68nM であった。

カルスペクチンは F－アクチンとともに細胞膜骨格の主要構成員であり，F－アクチン架橋作用を有することが知られている。そこでカルスペクチンと F－アクチンとの結合に及ぼすアネキシンVI の効果を検討するために，落下

球法による粘度変化測定と遠心法による結合実験を行った。F－アクチン溶液にカルスペクチンを加えると，カルスペクチンの架橋作用により溶液の粘度は上昇する。アネキシンⅥ はCa^{2+}，PS 依存性にこの粘度上昇を抑制した。この効果は Ca^{2+} 濃度依存性で，アネキシンⅥ とカルスペクチン間の結合と同一の Ca^{2+} 濃度依存性を示した。遠心法にて F－アクチンへのカルスペクチンの結合量を調べたところ，アネキシンⅥ は Ca^{2+}／PS 存在下に F－アクチンへのカルスペクチン結合を阻害した。以上の結果はアネキシンⅥ がカルスペクチンと結合し，その結果カルスペクチンを F－アクチンから解離させカルスペクチンによる F－アクチン架橋作用を抑制することを示す。

さらにカルスペクチン上のアネキシンⅥ 結合部位をトリプシンで限定分解したフラグメントを用いて検討した結果，アネキシンⅥ はカルスペクチンのβサブユニットN 端側部分に結合することが判明した。このN 端側部分は F－アクチン結合部位近傍であるのみならず，α－アクチニン，ジストロフィンと高い相同性を示す部分であった。すなわち，アネキシンⅥ はカルスペクチンの F－アクチン結合部位近傍に結合することにより，拮抗的にカルスペクチン－アクチン相互作用を阻害するものと考えられる。

［総　括］

神経細胞におけるアネキシンⅥ の機能を明らかにすることを目的として，アネキシンⅥ 結合蛋白質の検索法を開発した。その結果，アネキシンⅥ はラット脳において約14種類の蛋白質と結合することを見い出した。このうち分子量240kの蛋白質は，細胞膜骨格主要構成蛋白質カルスペクチンであることを同定した。アネキシンⅥ のカルスペクチンへの結合はカルスペクチンと F－アクチンとの結合を阻害し，かつカルスペクチンによる F－アクチン架橋作用を抑制した。細胞膜骨格は種々の刺激によりその消失，再構築が起こることが知られているが，今回の結果はアネキシンⅥ が細胞膜骨格の Ca^{2+} 制御因子として神経細胞において重要な役割を果たす可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

本研究は，Ca^{2+}，リン脂質結合能を有する一群の蛋白質アネキシンの機能を明らかにすることを目的として，神経細胞に比較的豊富に存在するアネキシンⅥ を対象にアネキシンⅥ 結合蛋白質の検索，同定及びその解析を行ったものである。本研究で開発した検索法を用いることにより，ラット脳に約14種類のアネキシンⅥ 結合蛋白質が存在し，この結合が，Ca^{2+}，リン脂質依存性であることを明らかにした。さらに，これらのアネキシンⅥ 結合蛋白質のうち分子量240kの蛋白質が細胞膜骨格主要構成員カルスペクチンであることを同定し，カルスペクチンへの Ca^{2+}，リン脂質依存性アネキシンⅥ 結合が，カルスペクチンの F－アクチン架橋作用を阻害することを見い出した。すなわち，Ca^{2+} 非存在下で結合しているカルスペクチンと F－アクチンに対し，アネキシンⅥ が Ca^{2+} 及びリン脂質により活性化されるとカルスペクチンとアネキシンⅥ が結合する。その結果，カルスペクチンと F－アクチンとの結合が阻害され，カルスペクチン－F－アクチン相互作用が阻害される。細胞膜骨格は種々の刺激によりその消失，再構築が起こることが知られている。本研究で得られた知見は，アネキシンⅥ が細胞膜骨格の Ca^{2+} 制御因子として神経細胞において重要な役割を果たす可能性を示唆しており，細胞生物学上有意義なものである。したがって本論文は博士の学位に値する。