

Title	Rabphilin-3A binds to a Mr 115,000 polypeptide in a phosphatidylserine-and Ca <sup>2+</sup> -dependent manner
Author(s)	宮崎, 睦雄
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/39688">http://hdl.handle.net/11094/39688</a>
DOI	
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏 名	みやざき むつお 宮 崎 睦 雄
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )
学 位 記 番 号	第 1 2 1 0 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 0 月 4 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	Rabphilin - 3A binds to a Mr 115,000 polypeptide in a phosphatidylserine - and Ca <sup>2+</sup> - dependent manner (ホスファチジルセリンとカルシウム依存性に Rabphilin - 3A に結合する 115KDa 蛋白質の同定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 鎌 田 武 信 (副査) 教 授 松 沢 佑 次      教 授 高 井 義 美

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目 的】

細胞外からの刺激によって分泌を行う Regulated secretion の機構は特に神経細胞で急速に解明されつつある。最近、低分子量GTP結合蛋白質の1つである *Rab3A* が前シナプスにおける神経伝達物質の輸送に関わっていることが明らかになっている。また、*Rab3A* の標的蛋白質として Rabphilin - 3A が精製され、その一次構造が明らかになっている。この Rabphilin - 3A は、シナプス小胞に局在していること、およびCキナーゼ類似のC2ドメインが2個存在Ca<sup>2+</sup>センサーとして機能している可能性が強いことより、神経伝達物質の放出において重要な役割をになっていると考えられる。

そこで、本研究では、*Rab3A* - Rabphilin - 3A がシナプスからの神経伝達物質の放出において果たす機能と作用機構を明らかにする目的で、(1) ウシ大脳膜画分より Rabphilin - 3A が結合する蛋白質を見出して精製すること、さらに (2) 精製したこの Rabphilin - 3A 結合蛋白質の特性について検討することを試みた。

### 【方法ならびに成績】

(1) Rabphilin - 3A 結合蛋白質の overlay assay による同定：ウシ大脳皮質部を細胞質画分と膜画分に分離した。

この細胞画質分あるいは膜画分をSDS - PAGE後 nitrocellulose filter に転写し、guanidine HClで処理後 non-fat powder milk を含む buffer で blocking した。次にこの filter を<sup>32</sup>Pで標識した Rabphilin - 3A およびそのN末端およびC末端フラグメントとCa<sup>2+</sup>と phosphatidylserine (PS) 存在下に室温で3時間反応させた。最後に Tween20を含む buffer で洗浄して、autoradiography を行った。ウシ大脳細胞質画分および膜画分にCa<sup>2+</sup>、PS依存性に Rabphilin - 3A およびC末端フラグメントと結合する 115KDa の蛋白質 (Rabphilin - 3A 結合蛋白質) を見だした。

(2) Rabphilin - 3A 結合蛋白質の精製：ウシ大脳膜画分より Rabphilin - 3A 結合蛋白質を1MNaClで抽出後、Mono Q, Mono Sカラムクロマトグラフィーにより順次精製した。その結果 Rabphilin - 3A およびC末端フラグメントに結合する 115KDa の蛋白質が得られた。

(3) Rabphilin - 3A 結合蛋白質の特性 : Rabphilin - 3A 結合蛋白質と Rabphilin - 3A C 末端フラグメントの結合の特性について検討した。1) Rabphilin - 3A 結合蛋白質と Rabphilin - 3A C 末端フラグメントの結合は  $\text{Ca}^{2+}$  と PS に依存性であり, half - maximal binding はそれぞれ  $3 \times 10^{-7} \text{M}$  および  $4 \mu \text{g/ml}$  であった。2) Rabphilin - 3A 結合蛋白質と Rabphilin - 3A C 末端フラグメントの結合は PS 以外のリン脂質 (phosphatidic acid, phosphatidyl - choline, phosphatidylethanolamine) では, PS の約 1/10 に減弱した。3) Rabphilin - 3A 結合蛋白質と Rabphilin - 3A C 末端フラグメントの結合は過剰量の非標識 N 末端フラグメントでは変化がなかったが, 過剰量の非標識 C 末端或いは C2 ドメインフラグメントにて消失した。

#### 【総括】

今回, 初めて Rabphilin - 3A 結合蛋白質をウシ大脳膜画分より精製した。Rabphilin - 3A 結合蛋白質は  $\text{Ca}^{2+}$  と PS 依存性に Rabphilin - 3A の C2 ドメインに結合していることが示された。その後, われわれは Rabphilin - 3A 結合蛋白質をアミノ酸解析して, これが  $\beta$  - adducin であることを解明した。 $\beta$  - adducin は大脳に豊富に存在し, calmodulin と結合することが明らかになっている。近年, C キナーゼや Phospholipase A2 など C2 ドメインを有している蛋白質が C2 ドメインを介して  $\text{Ca}^{2+}$  と PS 依存性に標的蛋白質に結合することで細胞質と細胞膜間を移動することが明らかになってきている。同様に, シナプス小胞輸送系において, Rabphilin - 3A の細胞内局在は  $\beta$  - adducin によって決定されている可能性がある。今後, 神経分泌にかかわる他の蛋白質との共役も考えながら, Rab 3A - Rabphilin - 3A -  $\beta$  - adducin 系が神経伝達物質の放出において果たす機能と作用機構を解明したい。

### 論文審査の結果の要旨

現在, 多くの分野で細胞内物質輸送に関する研究が精力的になされている。特に神経細胞における小胞輸送は, その発生および機能を考える上で非常に重要である。

本研究では, 低分子量 GTP 結合蛋白質の一つである Rab3A とその標的蛋白質である Rabphilin - 3A が関与すると考えられているシナプス小胞輸送系において, 神経伝達物質放出機構におけるこれらの蛋白質の作用仮説に基づき, その存在が想定された Rabphilin - 3A 結合蛋白質をウシ大脳より精製し, これが  $\beta$  - adducin であることを解明している。さらに  $\beta$  - adducin と Rabphilin - 3A の結合の性状についても検討を加え明確な結果を提示している。

今後, 神経伝達物質放出機構を考える上で重要な点を明らかにしており, 学位に値すると考える。