



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	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39688">https://hdl.handle.net/11094/39688</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

氏 名	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 $\text{Ca}^{2+}$ - 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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $^{32}\text{P}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ 、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。