

Title	Heterotetramer Formation of Prenylated Rab 3A with Two Rabphilin-3A Molecules
Author(s)	高橋, 和男
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40070
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	高橋和男
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 12979 号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Heterotetramer Formation of Prenylated Rab 3 A with Two Rabphilin-3 A Molecules (2分子の翻訳後脂質修飾を受けた Rab 3 A と2分子の Rabphilin-3 A によるヘテロ四量体の形成)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 谷口 直之 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

【目的】

私共の研究室では、低分子量 GTP 結合蛋白質 Rab 3 A とその標的蛋白質 Rabphilin-3 A が、神経伝達物質放出の制御に関与していることを明らかにしている。免疫組織学的に、Rab 3 A と Rabphilin-3 A は共にシナプス小胞上に濃縮されて存在している。しかし、*in vitro* の実験においては、Rab 3 A はシナプス小胞以外に、シナプス形質膜や赤血球膜にも結合する。また、その結合は飽和することではなく、Rab 3 A の翻訳後修飾された脂質部分と細胞膜のリン脂質との非特異的な結合であることが示唆される。一方、Rabphilin-3 A は、その構造上、膜貫通領域を有さないが、シナプス小胞上のアンカー蛋白質を介して Rab 3 A 非依存性にシナプス小胞に結合している。また、Rabphilin-3 A は少なくとも Rab 3 A と結合する N 末端領域と Ca²⁺ やリン脂質と結合する C 末端領域の2つの機能領域を有している。これらのことから、私共は、Rab 3 A が GTP 結合型の活性型に転換されると、Rabphilin-3 A の N 末端領域に結合することによってシナプス小胞に特異的に結合すると考えている。しかし、その際、脂質修飾を受けていない Rab 3 A も Rabphilin-3 A に結合することから、Rab 3 A の脂質修飾の機能については明らかになっていない。

そこで、本研究では、Rabphilin-3 A との結合における Rab 3 A の脂質修飾の機能について検討した。

【方法ならびに成績】

1) 材料の調整

脂質修飾をうけた Rab 3 A と Rabphilin-3 A は、ウシ大脳皮質膜画分より調整した標品を使用した。脂質修飾を受けていない Rab 3 A は、大量発現させた大腸菌の細胞質画分より調整した標品を使用した。Rabphilin-3 A の N 末端領域 (1-200 アミノ酸) のリコンビナント蛋白質は、グルタチオン S 転スフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として大腸菌に大量発現させて精製した後に、トロンピンを用いて GST を切離した標品を使用した。

2) 脂質修飾を受けた Rab 3 A の二量体形成

脂質修飾を受けた Rab 3 A と脂質修飾を受けていない Rab 3 A を、それぞれ 20 pmol ずつ用いて、活性型の GTP γ S 結合型にした後に、20 mM HEPES/NaOH (pH 7.4)、5 mM MgCl₂、1 mM DTT、10 μ M GTP γ S、0.26% CHAPS のバッファー条件で、5% から 40% までのショ糖密度勾配遠心分離を実施した。遠心分離した標品を 25 画分

に分取し、Rab 3 A に対する特異抗体を用いてイムノプロットを行い、ピークの同定を行った。脂質修飾を受けていない Rab 3 A は、分子量約25,000の位置に単一のピークを形成した。これは、SDS-PAGE から算出された分子量とほぼ一致しており、単量体を形成していることが明らかになった。一方、脂質修飾を受けた Rab 3 A は分子量約50,000の位置に単一のピークを形成した。これは、SDS-PAGE から算出された分子量の約2倍であり、二量体を形成していることが明らかとなった。

3) 脂質修飾を受けた Rab 3 A と Rabphilin-3 A によるヘテロ四量体の形成

脂質修飾を受けた Rab 3 A と脂質修飾を受けていない Rab 3 A を、それぞれ20 pmol ずつ用いて、活性型の GTP γ S 結合型にした後に、前述と同様のバッファー条件で、Rabphilin-3 A 存在下または非存在下で30分間反応させ、ショ糖密度勾配遠心分離を実施した。Rab 3 A と Rabphilin-3 A の各々のピークは各々の特異抗体を用いたイムノプロットによって同定した。Rabphilin-3 A 単独では分子量約80,000の位置にピークを形成し、SDS-PAGE から算出された分子量とほぼ一致しており、単量体を形成していることが明らかとなった。脂質修飾を受けていない Rab 3 A と Rabphilin-3 A を反応させた標品では、Rab 3 A と Rabphilin-3 A はともに分子量約105,000の位置に単一のピークを形成し、その量比は1:1であった。これは、SDS-PAGE から算出された分子量の和に一致しており、ヘテロ二量体を形成していることが明らかとなった。また、脂質修飾を受けた Rab 3 A と Rabphilin-3 A を反応させた標品では、Rab 3 A と Rab 3 A はともに分子量約210,000の位置に単一のピークを形成し、その量比は1:1であった。これは、SDS-PAGE から算出された分子量の和の約2倍に一致しており、ヘテロ四量体を形成していることが明らかとなった。

4) 脂質修飾を受けた Rab 3 A と Rabphilin-3 A の N 末端領域によるヘテロ四量体の形成

Rabphilin-3 A の N 末端領域を用いて、脂質修飾を受けた Rab 3 A と Rabphilin-3 A とのヘテロ四量体の形成における Rabphilin-3 A の C 末端領域の機能について検討した。Rabphilin-3 A の N 末端領域を、前述の如く Rab 3 A と反応させてショ糖密度勾配遠心分離を実施した。Rabphilin-3 A の N 末端領域単独では、分子量約27,000の位置にピークを形成し、SDS-PAGE から算出された分子量とほぼ一致しており、単量体を形成していることが明らかとなった。脂質修飾を受けていない Rab 3 A と反応させた標品では、Rab 3 A と Rabphilin-3 A はともに分子量約55,000の位置に単一のピークを形成し、その量比は1:1であった。これは、SDS-PAGE から算出された分子量の和に一致しており、ヘテロ二量体を形成していることが明らかとなった。また、脂質修飾を受けた Rab 3 A と反応させた標品では、Rab 3 A と Rabphilin-3 A はともに分子量約110,000の位置に単一のピークを形成し、その量比は1:1であった。これは、SDS-PAGE から算出された分子量の和の約2倍に一致しており、ヘテロ四量体を形成していることが明らかとなった。すなわち、Rabphilin-3 A の N 末端領域だけで Rab 3 A とヘテロ四量体を形成することが明らかとなった。

【総括】

本研究では、まず、脂質修飾を受けた Rab 3 A が二量体を形成していることを明らかにした。さらに、脂質修飾を受けた Rab 3 A と Rabphilin-3 A とがヘテロ四量体を形成していることを明らかにした。この四量体の形成は、Rabphilin-3 A 単独では二量体を形成しないことから、Rab 3 A による二量体の形成によって形成されることが明らかとなった。私共は、不活性型の GDP 結合型の Rab 3 A と結合する Rab GDI を見出ししている。この Rab GDI は、脂質修飾を受けた Rab 3 A とのみヘテロ二量体を形成することから、Rab 3 A が活性化されて二量体を形成することを制御していると考えられる。すなわち、Rab 3 A の脂質修飾は活性化された Rab 3 A が二量体を形成し、さらに Rabphilin-3 A とヘテロ四量体を形成する際に機能しているものと考えられた。しかし、生体内での生理的な意義は不明であり、今後さらに研究を続けていく必要がある。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により低分子量 GTP 結合蛋白質 Rab 3 A の脂質修飾部分が、その標的蛋白質 Rabphilin-

3 A との結合においてどのような機能を有しているかについて解析した。その結果、脂質修飾を受けた Rab 3 A が二量体を形成していることが明らかとなった。さらに、この二量体形成によって、脂質修飾を受けた Rab 3 A と Rabphilin-3 A とがヘテロ四量体を形成していることが明らかとなった。すでに見い出されている Rab GDI が、脂質修飾を受けた不活性型の GDP 結合型の Rab 3 A とのみヘテロ二量体を形成し、Rab 3 A が活性化されて二量体を形成することを制御していることから、Rab 3 A の脂質修飾は活性型の GTP 結合型の Rab 3 A が二量体を形成し、さらに Rabphilin-3 A とヘテロ四量体を形成する際に機能している可能性を十分に示唆するものであった。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究といえる。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。