



Title	Interaction of Rabphilin3 with Synaptic Vesicles through Multiple Regions
Author(s)	千本松, 孝明
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40872
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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

氏 名	千 本 松 孝 明 <small>せん ほん まつ たか あき</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 4 6 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 12 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	Interaction of Rabphilin3 with Synaptic Vesicles through Multiple Regions (複数の領域を介する Rabphilin3 のシナプス小胞への結合)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高井 義美 (副査) 教 授 米田 悦啓 教 授 中村 敏一

論 文 内 容 の 要 旨

〈目的〉

低分子量 G 蛋白質 Rab3A は, Ca^{2+} 依存性の分泌反応, 特に神経伝達物質の放出に関与していることが明らかになっており, その標的蛋白質として Rabphilin3 が見い出されている。Rabphilin3 は, 704個のアミノ酸からなる分子量 77,976の蛋白質で, アミノ酸配列は大部分が親水性で膜貫通領域を持たない。また, Rabphilin3 は, 少なくとも機能的に異なる 2つのドメインを有している。N末端側領域には Rab3A が結合するドメインが存在し, C末端側領域には Ca^{2+} とリン脂質が結合する C2 様ドメインが 2 個存在する。

Rabphilin3 は, 大脳に強く発現しており, 特に神経終末のシナプス小胞に存在している。現在, Rabphilin3 が, Ca^{2+} 依存性の分泌反応に関与していることが明らかになっており, 神経伝達物質の放出反応における Rabphilin3 の作用機構は次のように考えられている。活性型である GTP 結合型に変換された Rab3A は, シナプス小胞上に存在する Rabphilin3 と結合する。Rab3A と結合したシナプス小胞は前シナプス膜に移行し, Rab3A-Rabphilin3 複合体が前シナプス膜に存在すると考えられるそのアクセプター蛋白に結合してシナプス小胞は前シナプス膜にドッキングする。神経終末が脱分極して Ca^{2+} がシナプス内に流入すると, Ca^{2+} が Rabphilin3 に結合し, シナプス小胞が前シナプス膜と融合して神経伝達物質が放出されるという機構である。このように, Rabphilin3 は, 神経伝達物質の放出において Ca^{2+} センサーとして機能していると考えられる。一方, 膜貫通領域を持たない Rabphilin3 のシナプス小胞への結合様式に関して, Rabphilin3 が Rab3A 非依存性にシナプス小胞上の蛋白分子を介してシナプス小胞に結合していることが明らかになっている。しかし, Rabphilin3 が, どの領域を介してシナプス小胞上の蛋白分子に結合しているかは明らかではない。そこで, 本研究では, Rabphilin3 のシナプス小胞結合領域について検討した。

〈方法ならびに成績〉

1) 材料の調製 HA-tagged full-length Rabphilin3 と HA-tagged N末端側フラグメント (1-280 aa), HA-tagged C2 フラグメント (440-704 aa) は, バキュロウィルス発現系でそれぞれのリコンビナント蛋白質を過剰発現させた Sf9 細胞の膜分画より精製した。HA-tagged N末端側フラグメントは, Rab3A が結合するドメインを含んでいる。HA-

tagged C2 フラグメントは、 Ca^{2+} とリン脂質が結合する C2 様ドメインを 2 個含んでいる。抗 Rabphilin3 ポリクローナル抗体は、Rabphilin3 の GST-tagged N 末端側フラグメント (1-280 aa) を抗原として作成した。HA ならびにシナプトフィジンモノクローナル抗体は、ペーリンガー・マンハイム社製を使用した。PVDF 膜はミリポアー社製を使用した。Rabphilin3 とそのフラグメントのシナプス小胞への結合実験には、ラット大脳より調製したシナプス小胞を 1M NaCl で処理し、内在性 Rabphilin3 を欠如させたシナプス小胞を用いた。

2) Full-length Rabphilin3, N 末端側フラグメント, C2 フラグメントのシナプス小胞への結合 Full-length Rabphilin3, N 末端側フラグメント, C2 フラグメントのシナプス小胞への結合について検討した。

Rabphilin3 とそのフラグメントは、シナプス小胞に結合した。おのおののシナプス小胞への結合は、シナプス小胞をトリプシン処理することで減少した。おのおののトリプシン感受性のシナプス小胞への結合は、濃度依存性で飽和結合であった。half-maximal binding はすべて約 75 nM で、シナプス小胞 1 個あたりの最大結合量は、full-length Rabphilin3 が約 4 分子、N 末端側フラグメントと C2 フラグメントはおのおの約 2 分子であった。

3) N 末端側フラグメントまたは C2 フラグメント存在下における full-length Rabphilin3 のシナプス小胞への結合 種々の濃度の N 末端側フラグメントまたは C2 フラグメント存在下での full-length Rabphilin3 のシナプス小胞への結合について検討した。full-length Rabphilin3 のシナプス小胞への結合は、N 末端側フラグメントと C2 フラグメントによって濃度依存性に抑制されたが、最大結合量の半分までしか抑制されなかった。最大抑制時、N 末端側フラグメントと C2 フラグメントのシナプス小胞への結合は、シナプス小胞 1 個あたり約 2 分子で、IC₅₀ は約 100 nM であった。また、full-length Rabphilin3 と N 末端側フラグメントがおのおのシナプス小胞 1 個あたり約 2 分子結合する条件下で、種々の濃度の C2 フラグメントを加えたが、full-length Rabphilin3 のシナプス小胞への結合はシナプス小胞 1 個あたり約 2 分子のままであった。しかし、N 末端側フラグメントのシナプス小胞への結合は、濃度依存性に抑制された。full-length Rabphilin3 と C2 フラグメントがおのおのシナプス小胞 1 個あたり約 2 分子結合する条件下で、種々の濃度の N 末端側フラグメントを加えても同様の結果が得られた。

4) N 末端側フラグメント存在下における C2 フラグメントのシナプス小胞への結合 C2 フラグメントのシナプス小胞への結合は、N 末端側フラグメントによって濃度依存性に完全に抑制された。逆に、C2 フラグメントによって N 末端側フラグメントのシナプス小胞への結合も、濃度依存性に完全に抑制され、ともに IC₅₀ は約 100 nM であった。

<総括>
本研究の結果、Rabphilin3 の N 末端側フラグメントと C2 フラグメントが、シナプス小胞上の蛋白分子を介してシナプス小胞 1 個あたり最大約 2 分子結合することが明らかになった。この結合量は、full-length Rabphilin3 のシナプス小胞 1 個あたりの最大結合量の半分であった。また、full-length Rabphilin3 のシナプス小胞への結合は、N 末端側フラグメントと C2 フラグメントによってそれぞれ最大結合量の半分まで抑制された。このことから、Rabphilin3 は、少なくとも N 末端側領域または 2 個の C2 様ドメインを含む C2 領域を介してシナプス小胞上の蛋白分子に結合し、シナプス小胞に局在していることが明らかになった。また、Rabphilin3 のシナプス小胞への結合は、N 末端側フラグメントと C2 フラグメントによって相加的には抑制されなかった。このことから、シナプス小胞に存在する Rabphilin3 には、N 末端側領域または C2 領域を介してシナプス小胞に結合しているものと、それ以外の領域を介してシナプス小胞に結合しているものが存在することが明らかになった。ところで、Rabphilin3 の N 末端側領域と C2 領域の間には、カルモデュリンキナーゼ II によってリン酸化を受けるプロリンに富んだ M 領域が存在しており、第三の Rabphilin3 のシナプス小胞への結合領域の可能性が高いと考えられる。また、N 末端側フラグメントのシナプス小胞への結合は C2 フラグメントによって完全に抑制され、逆に C2 フラグメントのシナプス小胞への結合は N 末端側フラグメントによって完全に抑制された。このことから、Rabphilin3 は、N 末端側領域または C2 領域のどちらか一方を介してシナプス小胞に結合し、もう一方のシナプス小胞と結合していない領域を介して細胞質や前シナプス膜に存在する何らかの蛋白分子と結合する可能性が高くなった。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により神経伝達物質の放出に関与している低分子量G蛋白質 Rab3A の標的蛋白質である Rabphilin3 が、複数の領域を介してシナプス小胞上の蛋白分子に結合することを明らかにした。すなわち、Rabphilin3 には、少なくとも Rab3A が結合するN末端側領域と Ca^{2+} とリン脂質が結合する2個のC2様ドメインが存在しており、Rabphilin3 が、このN末端側領域またはC2領域を介してシナプス小胞に結合する以外に、それ以外の領域を介してシナプス小胞に結合することを明らかにした。また、Rabphilin3 が、N末端側領域またはC2領域のどちらか一方を介してシナプス小胞に結合し、もう一方のシナプス小胞と結合していない領域を介して細胞質や前シナプス膜に存在する何らかの蛋白分子と結合する可能性を示唆した。

神経伝達物質の放出機構において、 Ca^{2+} センサーとして機能していると考えられている Rabphilin3 のシナプス小胞への局在、ならびに蛋白分子を介したシナプス小胞への結合様式を明らかにできたことは、今後のこの分野の研究に極めて重要な意義を持つものと考えられる。今後の発展性や生命科学への貢献度から鑑み、学位授与に十分値するものと認める。