Osaka University Knowledge Archive

Title	Involvement of Rabphilin 3 in Endocytosis through Interaction with Rabaptin 5
Author(s)	大屋, 健
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41635
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【20】

氏　　名	大屋　健（おおや　たけし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　14449　号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	Involvement of Rabphilin3 in Endocytosis through Interaction with Rabaptin 5 （rabaptin 5を介したrabphilin 3のエンドサイトーシスへの関与）
論文審査委員	（主査） 教　授　高井　義美 （副査） 教　授　松澤　佑次　　教　授　米田　悦啓

論文内容の要旨

【目的】

低分子量G蛋白質Rabファミリーはendocytosisやexocytosisなどの細胞内小胞輸送を制御していることが明らかになっている。私共の研究室では，Rabファミリーメンバーの一つRab 3 Aとその標的蛋白質rabphilin 3を見出しており，これらの蛋白質が神経終末からの神経伝達物質の放出を制御していることを明らかにしている。その際，私共はGTP結合型に変換したRab 3 Aがシナプス小胞上のrabphilin 3と結合すると，シナプス小胞はプレシナプス形質膜にdockingしてfusionし，その結果，神経伝達物質が放出されると考えている。一方，Rab 5はendocytosisに関与しており，その標的蛋白質としてrabaptin 5が見出されている。GTP結合型に変換されたRab 5が細胞質よりrecruitされたrabaptin 5とearly endosome上で結合すると，endocytosisされた小胞とearly endosome，あるいはearly endosomeどうしのfusionが引き起こされると考えられている。神経終末ではシナプス小胞は神経伝達物質を放出した直後に再び細胞内に取り込まれると考えられており，exocytosisとendocytosisの共役機構は特に重要である。そこで私共はシナプス小胞のexocytosisとendocytosisの共役機構を明らかにする目的で，rabphilin 3に結合する分子を検索したところ，rabphilin 3とrabaptin 5が結合することを見出した。本研究では，Rab 5により制御されるendocytosisにおけるrabphilin 3の関与について検討した。

【方法ならびに成績】

1）材料の調製

ウシRab 3 Aとrabphilin 3はバキュロウイルス発現系を用いて大量発現したSf 9細胞の膜分画から精製した。ラットtruncated rabaptin 5（385－753アミノ酸）のリコンビナント蛋白質はグルタチオンSトランスフェラーゼ（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。

2）プラスミドの構築

HA epitope tagを付加したrabphilin 3の全長とN末端領域（1－280アミノ酸）のcDNAを，動物細胞発現ベクターであるpEF－BOSと，T 7 RNA polymeraseを組み込んだvaccinia virusにより大量発現が誘導されるベクターであるpGEMに挿入したプラスミドを構築した。HA epitope tagを付加したtruncated rabaptin 5のcDNAをpGEMに，myc epitope tagを付加したcDNAをpEF－BOSに挿入したプラスミドを構築した。さらに，myc

epitope tag を付加したヒトトランスフェリン受容体（hTfR）と Rab 3 の活性型変異体 Rab 3 AQ81 L の cDNA を pEF－BOS に挿入したプラスミドを構築した。

3）rabphilin 3 結合蛋白質の検索

yeast two-hybrid 法を用いて，rabphilin 3 のN末端領域とC末端領域のそれぞれの結合蛋白質をラット大脳の cDNA library より検索した。C末端領域に結合するクローンは見出せなかったが，N末端領域に結合するクローンは数個見出せ，その一つは rabaptin 5 の385－753アミノ酸領域をコードする cDNA であった。また，同クローンは yeast two-hybrid 法で，rabphilin 3 の全長にもN末端領域にも結合したが，C末端領域には結合しなかった。

4）rabphilin 3 と rabaptin 5 の細胞内での結合

HA epitope tag を付加した rabphilin 3 と rabaptin 5 をラット褐色細胞腫由来の細胞株 PC12細胞に vaccinia virus を用いて一過性に過剰発現させ，抗 rabphilin 3 抗体により免疫沈降し，抗 HA 抗体で Western blotting して細胞内での結合を検討した。rabphilin 3 あるいは rabaptin 5 をそれぞれ単独に発現させると，どちらの場合でも rabaptin 5 は免疫沈降されなかったが，rabphilin 3 と rabaptin 5 を共に発現させると rabphilin 3 と共に rabaptin 5 の免疫沈降が見られた。

5）rabphilin 3 と rabaptin 5 の結合に対する Rab 3 Aの影響

GST－rabaptin 5 と GST をそれぞれグルタチオンビーズに固定し，精製した rabphilin 3 と反応させると，GST－rabaptin 5 と rabphilin 3 の結合は見られたが，GST と rabphilin 3 の結合は見られなかった。Rab 3 Aの活性型で rabphilin 3 のN末端領域に結合する GTPγS－Rab 3 Aと共に rabphilin 3 を GST－rabaptin 5 と反応させると，rabphilin 3 と rabaptin 5 の結合は阻害された。

6）rabphilin 3 のヒトトランスフェリン（hTf）エンドサイトーシスに及ぼす影響

内在性に hTfR を発現していない PC12細胞に hTfR を過剰発現させると，培養液中の FITC 蛍光ラベルした hTf の endocytosis による細胞内取り込みが見られた。しかし hTfR と共に rabphilin 3 のN末端領域を過剰発現させた PC12細胞は，hTf を細胞内に取り込むことができなかった。hTfR，rabphilin 3 のN末端領域に加え，Rab 3 AQ81 L や rabaptin 5 をさらに共に発現させた PC12細胞では，hTf の取り込みの回復が見られた。内在性に hTfR を発現している HeLa 細胞においても，rabphilin 3 のN末端領域の過剰発現により hTf の取り込みの抑制が見られ，Rab 3 AQ81 L や rabaptin 5 を共に発現することによりその抑制の解除が見られた。

【総括】

本研究では，まず，rabphilin 3 と rabaptin 5 が直接接合することを，yeast two-hybrid 法，免疫沈降法，affinity column chromatography の異なった 3 種類の方法で明らかにした。また，この結合は rabphilin 3 と GTP－Rab 3 Aが結合しているときは阻害されることを明らかにした。さらに，PC12細胞と HeLa 細胞の 2 つの細胞系において，rabphilin 3 のN末端領域の過剰発現により，hTf の endocytosis の抑制を認め，その抑制は rabaptin 5 や Rab 3 A活性型変異体を共に発現することにより解除されることを明らかにした。これらの結果から，過剰発現させた rabphilin 3 のN末端領域は内在性の rabaptin 5 と結合し，その機能を阻害することが示唆される。また，Rab 3 A活性型変異体を共に発現させることにより rabphilin 3 と rabaptin 5 の結合が阻害され，内在性の rabaptin 5 は機能を回復するものと考えられる。本研究の成果により，exocytosis が終了して，GDP 結合型に変換された Rab 3 A が rabphilin 3 より離れると，rabphilin 3 は rabaptin 5 と結合して endocytosis に作用することが示唆された。exocytosis と endocytosis 各々の機序もいまだ不明な点が多く，それらの詳細と共にこの共役機構を今後もさらに解明していく必要がある。

論文審査の結果の要旨

本申請者は，本研究により，神経伝達物質の放出時のシナプス小胞の exocytosis と endocytosis の共役機構を明らかにすることを試みた。その結果，exocytosis に関与する Rab 3 －rabphilin 3 系の rabphilin 3 が，endocytosis に

関与するRab 5 －rabaptin 5系のrabaptin 5と直接結合することを見い出した。また，この結合は活性型Rab3 Aがrabphilin 3に結合することによって阻害されることも示した。さらに，実際，細胞内にrabphilin 3のrabaptin 5結合領域を過剰発現させることにより，トランスフェリンのendocytosisが抑制されることも明らかにした。本研究により，神経終末において，Rab 3 －rabphilin 3系によるexocytosisが終了後，Rab 3が離れてfreeになったrabphilin 3がrabaptin 5に結合してendocytosisにも作用することにより，exocytosisとendocytosisがスムーズに連結されることが示唆された。

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。