

Title	Identification of a Rabphilin-3A-interacting Protein as GTP Cyclohydrolase I in PC12 Cells
Author(s)	今住, 克則
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43018
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	いま 今 づみ 住 かつ 克 のり 則
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 9 5 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 9 月 30 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	Identification of a Rabphilin-3A-interacting Protein as GTP Cyclohydrolase I in PC12 Cells (PC12細胞におけるRabphilin-3A結合蛋白質としてのGTP Cyclohydrolase Iの同定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高 井 義 美 (副査) 教 授 倉 智 嘉 久 教 授 米 田 悦 啓

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

最近、私共や他の研究室の研究結果から、Rab3A 低分子量 G 蛋白質が Ca^{2+} 依存性の神経伝達物質の放出において重要な役割を果たしていることが明らかになっている。私共の研究室では、Rab3A の標的蛋白質として Rabphilin-3A を見い出している。現在のところ、神経伝達物質の放出反応における Rab3A-Rabphilin-3A 系の作用機構の詳細については不明であるが、私共は次のようなモデルを考えている。不活性型である GDP-Rab3A は、Rab GDI と複合体を形成し、プレシナプスの細胞質に存在している。何らかの機序で GDI が解離すると、Rab3GEP により活性型である GTP 結合型に変換され、アンカー蛋白質を介してシナプス小胞上に結合していると考えられる Rabphilin-3A と結合する。Rab3A の結合したシナプス小胞はプレシナプス膜に移行し、Rab3A-Rabphilin-3A 複合体が、プレシナプス膜に存在すると考えられるアクセプター蛋白質に結合し、シナプス小胞とプレシナプス膜がドッキングする。その後、神経終末の脱分極により Ca^{2+} がプレシナプス内に流入すると、シナプス小胞がプレ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モデルである。本研究では、Rabphilin-3A の機能を明らかにする目的で、抗 Rabphilin-3A 抗体を用いた免疫沈降法により Rabphilin-3A 結合蛋白質の同定を試みた。

[方法ならびに成績]

- 1) 抗 Rabphilin-3A 抗体を用いた免疫沈降法による Rabphilin-3A 結合蛋白質の同定 PC12 細胞を低濃度 (4.7 mM) または高濃度 (60 mM) の KCl 溶液で刺激後粉碎し、lysate 中の Rabphilin-3A を抗 Rabphilin-3A 抗体を用いて免疫沈降した。さらに、免疫沈降物を SDS-PAGE 後クマシー染色し、Rabphilin-3A と共に免疫沈降される蛋白質を同定した。いずれの場合も、Rabphilin-3A と共に分子量30、48および110 kDa の蛋白質が免疫沈降された。
- 2) 高濃度 KCl 溶液刺激による Rabphilin-3A 結合蛋白質のリン酸化 あらかじめ [3H] norepinephrine を取り込ませた PC12 細胞を用いて、高濃度 KCl 溶液刺激では norepinephrine が分泌され、低濃度 KCl 溶液刺激ではほとんど分泌がみられないことを確認した。さらに、あらかじめ無機リンでラベルした PC12 細胞を同じ条件下で処理後粉碎し、lysate 中の Rabphilin-3A を抗 Rabphilin-3A 抗体を用いて免疫沈降した。免疫沈降物のリン酸化は SDS-PAGE 後オ

ートラジオグラフィーにて検討した。高濃度 KCl 溶液刺激では低濃度 KCl 溶液刺激に比べて Rabphilin-3A のリン酸化の程度の上昇がみられた。さらに、Rabphilin-3A 結合蛋白質のうち、30 kDa の蛋白質は、高濃度 KCl 溶液刺激時にのみリン酸化されることが明らかになった。

3) 30 kDa 蛋白質の同定 抗 Rabphilin-3A 抗体による免疫沈降物の SDS-PAGE を行い、30 kDa の Rabphilin-3A 結合蛋白質をゲルから切り出してリシルエンドペプチダーゼで処理した後、逆相カラムを用いてペプチドマッピングを行った。さらに、分画された10個以上のペプチドのうち、2個のペプチド断片についてアミノ酸配列を決定したところ、30 kDa の Rabphilin-3A 結合蛋白質は GTP cyclohydrolase I であることが判明した。

[総括]

本研究では、PC12 細胞中に Rabphilin-3A 結合蛋白質が少なくとも3個存在すること、および、それらのうち、分子量30 kDa の蛋白質は、分泌刺激依存性にリン酸化されることが明らかになった。さらに、その30 kDa の蛋白質は、アミノ酸配列の解析により、GTP cyclohydrolase I であることが明らかになった。GTP cyclohydrolase I は、catecholamine や serotonin の生合成に関与する tetrahydrobiopterin を GTP より産生する酵素である。この酵素はカゼインキナーゼ II やプロテインキナーゼ C、カルモデュリンキナーゼ II によるリン酸化部位を有していることから、リン酸化による制御が推測されていたが、本研究で初めて細胞内で分泌刺激依存性にリン酸化されることが示された。一方、本研究では、Rabphilin-3A と GTP cyclohydrolase I との結合の生理学的意義までは明らかにできなかった。しかしながら、最近、tetrahydrobiopterin が nitric oxide (NO) 産生に関与していることや、NO がプレシナプスからの Ca²⁺ 非依存性神経伝達物質の放出に関与していることが報告されている。したがって、Rabphilin-3A が GTP cyclohydrolase I による NO 合成を制御することによって、NO による神経伝達物質の放出機構の制御にも関与している可能性が考えられた。今後、さらに、Rabphilin-3A と GTP cyclohydrolase I の結合の生理的意義を解析していく必要がある。

論文審査の結果の要旨

Rab3A 低分子量 G 蛋白質とその標的蛋白質 Rabphilin-3A は、神経伝達物質の放出に関与することが明らかになっているが、現在のところ、その作用機構の詳細は不明である。本申請者は、本研究において、Rabphilin-3A の作用機構を明らかにする目的で、Rabphilin-3A の結合蛋白質の同定を試みた。PC12 細胞の cell lysate から、抗 Rabphilin-3A 抗体による免疫沈降を行い、30、48、110 kDa の蛋白質が Rabphilin-3A と共に免疫沈降されることを示した。そのうち、30 kDa の蛋白質は、細胞内で分泌刺激依存性にリン酸化されることを明らかにした。さらに、30 kDa の蛋白質の部分アミノ酸配列を決定し、本蛋白質が GTP cyclohydrolase I であることを明らかにした。GTP cyclohydrolase I は tetrahydrobiopterin 産生の律速酵素であるが、この tetrahydrobiopterin は一酸化窒素 (NO) 産生の補酵素であることが知られている。したがって、Rabphilin-3A は GTP cyclohydrolase I に結合して本酵素の活性を制御することにより NO 産生を調節し、その結果、NO による神経伝達物質の放出の制御に関与している可能性が考えられた。

最近、Rab3A は神経伝達物質の放出の調節を介して記憶や学習などの高次脳機能に関わっている可能性が出てきている。したがって、Rabphilin-3A を始めとする Rab3A 関連蛋白質の作用機構を明らかにすることは医学的にも重要であると考えられる。今回、Rabphilin-3A の結合蛋白質のひとつが GTP cyclohydrolase I であること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。