

氏名	庄野修 <small>しょうの おさむ</small>
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2095号
学位授与の日付	平成11年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物物理学専攻
学位論文題目	網膜Gタンパク質トランスデュースン $\alpha$ サブユニットの不均一なN末端脂肪酸修飾の生理的役割

(主査)

論文調査委員	教授 高橋 徹	教授 七田 芳則	教授 西田 栄介
--------	---------	----------	----------

## 論文内容の要旨

Gタンパク質は3量体タンパク質で、アルファサブユニットにはGTP分解活性がある。脊椎動物の視細胞はロドプシンが光を受容して受容器電位を発生するが、この情報変換もGタンパク質であるトランスデュースンを介して行われる。トランスデュースンのアルファサブユニット( $T\alpha$ )のN末端は、ミリスチン酸(C14:0) C14:1(5-cis) C14:2(5-cis, 8-cis) およびラウリン酸(C12:0)という計4種類の脂肪酸によって修飾されていることが知られている。このようなアシル鎖の違いが各種の $T\alpha$ と他のサブユニット $T\beta\gamma$ の間の相互作用の差に関係していると考えられているが、しかし不均一なアシル鎖の修飾に関しては依然として不明な点が多い。従って本研究ではまず、4種類のアシル化 $T\alpha$ アイソフォームが一つの視細胞桿体に共存しているのか、それとも1種の細胞中にはただ一つの $T\alpha$ アイソフォームしか存在しないのかを明らかにするために、 $T\alpha$ のN末端9残基のアミノ酸配列を持つペプチドを、 $T\alpha$ のN末端アシル鎖となる4種類の脂肪酸で修飾したものを抗原として、抗体を作成することを試みた。アシル化ペプチドに対する反応性に基づいてハイブリドーマを5つのタイプに分類した。このうち、モノクローナル抗体LA4はC12:0  $T\alpha$ のみに対して反応したが、LB1, LC1, M1, M2, D1などは4種類のアシル化ペプチドに対する反応性に差は見られるものの、どれか一つに選択的とはいかなかった。従ってこのLA4を用いた3種類の異なる染色手法による免疫組織化学的な検討を行った結果、C12:0- $T\alpha$ はほぼすべての視細胞桿体の外節に均一に分布していることが判った。この結果を、ウシ桿体型 $T\alpha$ (Gt1 $\alpha$ )のセリン153-トレオニン166に相当する合成ペプチドを抗原として調製され、ウシ、ニワトリ網膜のすべての視細胞桿体外節と反応することが知られているPTr $\alpha$ 抗体を用いた場合の染色像と比較すると、桿体細胞数に対する抗体染色陰性の桿体の割合はLA4:pTr $\alpha$ =2.38:2.46と両者はほぼ一致した。他のアイソフォームに対する選択的な抗体が得られなかったため、それらアイソフォームが局在するかどうかについては結論が得られなかったが、C12:0- $T\alpha$ の結果は4種類のアイソフォームが単一の桿体内に共存していることを強く示唆していると考えられた。すなわちロドプシンが捕捉した光情報は、それぞれ特徴的な情報変換活性を持つ4種類の $T\alpha$ アイソフォームに伝達される。視細胞内節にもLA4とpTr $\alpha$ 抗体に対する陽性反応が見られたが、このことは外節に輸送される前に桿体 $T\alpha$ はラウリル化されることを示すが、これはタンパク質のN末端脂肪酸修飾が翻訳途中で起こるといふこれまでに得られていた知見と一致する。

次に、トランスデュースンとは異なる組織分布を示す網膜のGタンパク質のアルファサブユニットGo $\alpha$ が $T\alpha$ のような不均一な修飾を受けているかどうかを明らかにすることを試みた。網膜Go $\alpha$ のN末端の構造解析を行ったところ、 $T\alpha$ とは対照的に、網膜Go $\alpha$ のN末端にはミリスチン酸(C14:0)のみが存在することが判った。網膜においてGo $\alpha$ は視細胞層とは異なる領域に局在していることから、視細胞以外の細胞においてはミリスチン酸のみによる修飾が行われていることが強く示唆された。すなわち、不均一な脂肪酸修飾は視細胞に特異的な現象である可能性が高い。

これらの知見をまとめると、N末端の不均一な脂肪酸修飾は、視細胞における光情報の伝達においては、複数の活性の異

なるアイソフォームを含むことによって生理的な役割を果たしていると考えられる。今後は、このような複数の構成要素を有するシステムと、単一の構成要素のみからなるシステムとの間の光応答の出力の違いを比較することが出来れば、不均一な脂肪酸修飾の生理的な意味を明らかにすることが出来るであろう。

## 論文審査の結果の要旨

トランスデューシン (T) は視細胞に存在するGタンパク質で、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の3つのサブユニットからなっている。視細胞が吸収した光は情報変換され、視神経に出力されるが、この情報変換を司るのがトランスデューシンである。視物質であるロドプシンは光を吸収し、いくつかの中間体を経てメタロドプシンIIが生成する。このメタロドプシンIIにGDP結合型の $T\alpha$ と $T\beta\gamma$ が会合し、GDPが解離して代わりにGTPが $T\alpha$ に結合すると今度は $T\alpha$ -GTP、 $T\beta\gamma$ に解離する。 $T\alpha$ -GTPがcGMPaseを活性化して細胞内cGMP濃度の低下と共に形質膜に存在するcGMP依存性チャネルが閉じて受容器電位が発生するという形で情報変換が起こる。 $T\alpha$ サブユニットと $T\beta\gamma$ との相互作用がこの過程において重要な役割を担っているが、 $T\alpha$ のN末端領域がこれを支配しており、N末端を修飾する脂肪酸はGタンパク質を膜に固定する役割のみならず、この相互作用にも重要な関係を有することが明らかになってきた。ウシ桿体視細胞の $T\alpha$ のN末端修飾脂肪酸としては現在、ミリスチン酸 (C14:0)、C14:1 (5-cis) C14:2 (5-cis, 8-cis)、およびラウリン酸 (C12:0) という4種が知られている。単一のタンパク質が複数種の修飾を受けていることは異例であるが、 $T\alpha$ のN末端9残基のアミノ酸配列を持つペプチドをこれら4種の脂肪酸それぞれで修飾したペプチドは何れも $T\alpha$ と $T\beta\gamma$ の会合を阻害し、しかも阻害の程度は脂肪酸それぞれで違っていることが示されている。すなわち情報変換の効率は脂肪酸の種類によっていることになり、どのような脂肪酸で修飾されているか、各修飾体は視細胞内でどのような分布をしているかという研究は極めて重要である。この点に関し、申請者は

(1)脂肪酸構造の異なる4種類の $T\alpha$ アイソフォームは一つの桿体視細胞に共存しているのか、それとも特定のアイソフォームのみを持つ細胞が存在しているのか、

(2) $T\alpha$ とは異なる組織内分布を示す網膜のGタンパク質 $\alpha$ サブユニットは同じように不均一な修飾を受けているのか。という問題設定をし、それらを明らかにする実験を行った。(1)に関しては脂肪酸鎖長を区別するモノクローナル抗体を用いて少なくともC12で修飾された $T\alpha$ はすべての視細胞桿体外節に分布することが示され、その結果、細胞ごとに情報変換活性の本質的差はないであろうこと、ロドプシンからの光情報は一つの細胞内でそれぞれ特異的な情報変換活性を持つ4種類の $T\alpha$ アイソフォームに伝達されることが示唆された。(2)に関しては、網膜Go $\alpha$ にあつては $T\alpha$ と異なり、ただ1種だけの脂肪酸修飾が見いだされ、不均一な脂肪酸修飾は視細胞に特異的な現象である可能性が高くなった。何れも視覚における情報変換過程の分子論的基礎として極めて高く評価されるものである。各視細胞においてアイソフォームの分布が均一であるのか、それぞれのアイソフォームの情報変換活性がどのように異なるのか等が、今後の課題として残されている。

従来、分子生物学的研究においては生物学的事項に重点が置かれ、ややもすると物質の同定、確認等、化学的基盤が軽視される傾向があるが、本論文においてはその点にも重点が置かれ、ペプチド合成、質量分析、逆相クロマトグラフなどの新しい方法を駆使して、それらに関しても理解が十分であると判断された。本論文の学界に対する寄与は充分大きいと判断し、なお関連する事項に関しても試問を行い、合格と判定した。