

## 論文の内容の要旨

論文題目 視細胞 G 蛋白質トランスデュースン $\alpha$ サブユニットの  
不均一な N 末端脂肪酸修飾の意義

氏名 橋本 祐一

脊椎動物の網膜には桿体と錐体という 2 種類の視細胞が存在する。このうち桿体はおもに薄明視を担い、わずかな光を高度に増幅する。ロドプシンが光を吸収するとメタロドプシン II ( $Rh^*$ ) が生成し、 $Rh^*$  はさらに GDP 結合型の三量体 G 蛋白質トランスデュースン ( $G_{t1\alpha}/G_{\beta1\gamma1}$ ) と結合して  $G_{t1\alpha}$  の GDP/GTP 交換反応を触媒する。この反応で GTP 結合型に変換された  $G_{t1\alpha}$  ( $G_{t1\alpha}$ -GTP) は  $G_{\beta1\gamma1}$  や  $Rh^*$  との親和性を失い、両者から解離した  $G_{t1\alpha}$ -GTP が cGMP 分解酵素を活性化する。その結果、過分極性の受容器電位が発生する。この過程で、 $Rh^*$  はさらに別の GDP 結合型  $G_{t1\alpha}/G_{\beta1\gamma1}$  と会合し、同じサイクルを繰り返すことにより  $G_{t1\alpha}$ -GTP を次々に生成する。 $Rh^*$  によるトランスデュースンの活性化 (増幅) 効率は極めて高く、1 分子の  $Rh^*$  の触媒作用により 500 分子もの  $G_{t1\alpha}$ -GTP が生成する。つまり  $G_{t1\alpha} \cdot G_{\beta1\gamma1} \cdot Rh^*$  という 3 つの蛋白質の解離・会合プロセスは、この数百倍にも及ぶ光シグナルの増幅過程において極めて重要なステップとなっている。

$G_{t1\alpha}$  の N 末端 Gly には、C14:0 (ミリスチン酸) の他に C14:1 (5-*cis*)、C14:2 (5-*cis*, 8-*cis*)、C12:0 (ラウリン酸) という 4 種の脂肪酸のいずれか 1 つが結合している。このように不均一な脂肪酸修飾は極めて珍しいが、 $G_{t1\alpha}$  のほかに、視細胞の光情報制御に関与するリカバリンやグアニル酸シクラーゼ活性化蛋白質、cAMP 依存性蛋白質キナーゼ (A キナーゼと略す) の触媒サブユニットにも見られる。しかし、同じ A キナーゼ触媒サブユニットであっても、心臓や肺由来の蛋白質からは、ミリスチン酸のみが検出されることより、 $G_{t1\alpha}$

に見出されたような不均一な脂肪酸修飾は、視細胞（網膜）に特異的な現象であると考えられている。

一般に、蛋白質に共有結合した修飾脂質は、蛋白質を細胞膜につなぎ止めるアンカーとして機能すると考えられている。しかし、アシル化ペプチドを用いた実験から、N末端の修飾構造が異なる4種類のG $\alpha$ は、それぞれG $\beta_1\gamma_1$ に対して異なる親和性をもつ可能性が示された。これらのことから、蛋白質同士または蛋白質と脂質膜との相互作用を介して、G $\alpha$ の不均一なN末端構造は、桿体視細胞に特徴的な機能（例えば光シグナルの高度な増幅）に大きく貢献している可能性がある。

そこで本研究では、G $\alpha$ のN末端脂肪酸の構造とG $\alpha$ の機能との相関に関して次の2点に注目した。つまり、1) G $\alpha$ のN-アシル基はトランスデュースの機能にどのような役割をもつか。2) N末端の脂肪酸構造が異なるG $\alpha$ アイソフォームの機能は異なるのか。これらの疑問に答えるためには、N-アシル化G $\alpha$  (C14:0-G $\alpha$ )を調製することが必須である。そこで、N末端脂肪酸修飾型の発現が困難なG $\alpha$ に代えて、G $\alpha$ /G $\alpha$ キメラ（以下G $\alpha$ と表記）をSf9細胞に発現させ、N末端修飾型G $\alpha$ の調製を試みた。Sf9細胞は内在性のN-ミリスチル基転移酵素 (NMT) 活性を持つため、N-ミリスチル化G $\alpha$ の発現が期待できる。G $\alpha$ をSf9細胞に発現させると、発現したG $\alpha$ のおよそ10%が水溶性画分に回収された。5段階のカラムクロマトグラフィーにより、水溶性画分からG $\alpha$ を高純度に精製できた。精製した水溶性G $\alpha$  (cytosolic G $\alpha$ と表記)をエンドプロテイナーゼ Asp-Nにより完全消化して逆相HPLCにロードし、全てのピーク画分をMALDI-TOF/MS分析に供したところ、N末端未修飾型 (N末端はGly)であることが判った。つまり、N末端脂肪酸部分のみを欠いたG $\alpha$ を調製できた。上記の結果より、N-アシル化G $\alpha$ が発現しているとすれば膜画分に蓄積すると考えられた。そこで、G $\alpha$ を発現させたSf9細胞の膜画分からG $\alpha$ を精製することを試みたが、強い凝集のために可溶化することができなかった。そこで、G $\beta_1\gamma_1$ をG $\alpha$ と共発現させたところ、発現したG $\alpha$ は、その80%が膜画分に局在し、そのうち20~30%が界面活性剤CHAPSにより可溶化された。CHAPS可溶化画分に含まれるG $\alpha$  (membrane G $\alpha$ と表記)は3段階のカラムクロマトグラフィーにより高純度に精製できた。membrane G $\alpha$ は、ゲル濾過カラムにおいてG $\beta_1\gamma_1$ と共溶出されたことと、クマシーブルーにより染色したG $\alpha$ のバンド強度は共精製されたG $\beta_1$ のバンド強度とほぼ同じことから、membrane G $\alpha$ はG $\beta_1\gamma_1$ との三量体として精製されたと考えられた。membrane G $\alpha$ のN末端構造を決定するため、リジルエンドペプチダーゼ (API)を用いてmembrane G $\alpha$ /G $\beta_1\gamma_1$ 三量体を完全消化し、消化産物を逆相HPLCに供した。G $\alpha$ のN末端ペプチドを同定するため、全てのピーク画分をMALDI-TOF/MS分析に供するとともに、逆相HPLCにおいて、合成したN-ラウリル化およびN-ミリスチル化ペプチド (G $\alpha$ のN末端9アミノ酸残基;それぞれ

C12:0- $\alpha$ N9、C14:0- $\alpha$ N9 と表記) と保持時間の比較を行った。その結果、C14:0- $\alpha$ N9 だけでなく、C12:0- $\alpha$ N9 に保持時間と質量値の一致する断片を見出した。逆相 HPLC におけるこれら 2 種のペプチドのピーク面積より C14:0 と C12:0 修飾型のモル比は 9:1 と算出された。また、C12:0-G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 の N 末端部位を特異的に認識するモノクローナル抗体 (LA4) を用いたイムノプロット解析によっても、membrane G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 標品の中に C12:0 修飾型 G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 (C12:0-G $\beta$ 1 $\gamma$ 1) が存在することが確認できた。さらに、C14:1 および C14:2 により N-アシル化されたペプチドの質量値に一致する断片は、membrane G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 の API 消化産物からは検出できなかった。よって、membrane G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 は 2 種の脂肪酸、つまり C14:0 (~90%) と C12:0 (~10%) により不均一に修飾されていると結論した。この結果は、Sf9 細胞の NMT が基質とし得る C14:0-CoA と C12:0-CoA が細胞内に存在することを示している。そこで、発現培地の組成を換えれば G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 の N-アシル基組成を制御できると考え、G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 発現培地に C14:0 を添加し、回収した細胞の CHAPS 可溶化画分に含まれる C12:0-G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 量を LA4 を用いたイムノプロット解析により推定した。その結果、C12:0-G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 量は検出限界以下に減少した。一方、C12:0 を添加すると、その濃度に依存して C12:0-G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 の含有率は上昇した。よって、C12:0 あるいは C14:0 を G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 発現培地に添加すれば、Sf9 細胞に発現する G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 に占める C12:0-G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 の含有率を変化させ得ることが判った。続いて、大量の培養液 (各々 2~6L) から調製した数種の membrane G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 標品を、上述と同様に分析したところ、C12:0-G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 の含有率が互いに異なる複数の G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 標品を得ることが出来た (表 1)。このことにより、N-アシル基が G 蛋白質 $\alpha$ サブユニット

の機能に及ぼす効果を直接的に評価することが初めて可能となった。そこで、再構成系において Rh\* が触媒する steady-state GTP 水解反応速度を、種々の G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 標品について測定した。その結果、cytosolic G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 は、網膜 G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 存在下において

表 1. Sf9細胞を用いて発現・精製したG $\beta$ 1 $\gamma$ 1のN末端構造  
G $\beta$ 1 $\gamma$ 1-1, -2, -3, -4および-5標品は、ミリスチン酸(Myristic acid)あるいはラウリン酸(Lauric acid)添加培地を用いて発現させ、CHAPS可溶化画分からG $\beta$ 1 $\gamma$ 1/G $\beta$ 1 $\gamma$ 1三量体として精製した。一方、cytosolic G $\beta$ 1 $\gamma$ 1は、G $\beta$ 1 $\gamma$ 1単量体として発現させ、水溶性画分から精製した。C12:0修飾型(C12:0-modified)、C14:0修飾型(C14:0-modified)および未修飾型(unmodified) G $\beta$ 1 $\gamma$ 1の含有率は、G $\beta$ 1 $\gamma$ 1の酵素消化産物から逆相HPLCカラムによって分離したN末端断片のピーク面積から推定した。G $\beta$ 1 $\gamma$ 1-4および-5に含まれるC12:0修飾型G $\beta$ 1 $\gamma$ 1の含有率の推定は、G $\beta$ 1 $\gamma$ 1-3を標準物質として作成した検量線を用いて行なった。membrane G $\beta$ 1 $\gamma$ 1-5は、ウイルス感染から24時間後に培地にLauを添加して発現・精製したものであり、それ以外のmembrane G $\beta$ 1 $\gamma$ 1はいずれもウイルス感染後すぐに脂肪酸を添加した培地を用いて発現・精製した。

Preparations	membrane G $\beta$ 1 $\gamma$ 1-1	membrane G $\beta$ 1 $\gamma$ 1-2	membrane G $\beta$ 1 $\gamma$ 1-3	membrane G $\beta$ 1 $\gamma$ 1-4	membrane G $\beta$ 1 $\gamma$ 1-5	cytosolic G $\beta$ 1 $\gamma$ 1
Fatty acid supplied (final concentration)	Myr (100 $\mu$ M)	Lau (500 $\mu$ M)	Lau (500 $\mu$ M)	Lau (1 mM)	Lau (500 $\mu$ M)	none
N-terminal structure						
C12:0-modified	— <sup>a</sup>	20%	33%	~70%	~40%	— <sup>a</sup>
C14:0-modified	100%	80%	67%	N.D. <sup>b</sup>	N.D. <sup>b</sup>	— <sup>a</sup>
unmodified	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	N.D. <sup>b</sup>	N.D. <sup>b</sup>	100%

<sup>a</sup>Not detected. <sup>b</sup>Not determined.

GTP 水解速度 (GTP-turnover 速度) は非常に遅かった。さらに複数の membrane G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 標品

の中で、membrane  $G_{\beta\gamma}$ が最も速い GTP-turnover 速度を示し、membrane  $G_{\beta\gamma}$ -2、membrane  $G_{\beta\gamma}$ -3、membrane  $G_{\beta\gamma}$ -4 の順にその速度は減少した (図1)。この GTP-turnover 速度の順序は、C14:0および C12:0- $G_{\beta\gamma}$ の含有率と相関を示し、精製標品に含まれる

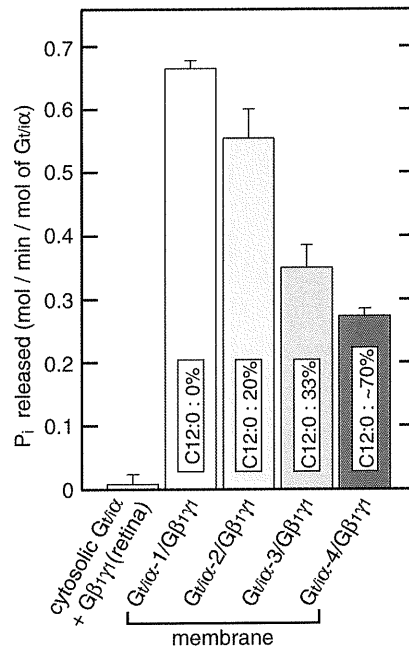


図1. Steady-stateのGTP水解速度に及ぼす $G_{\beta\gamma}$ のN末端アシル基の効果

PCリポソームに再構成したウシロドプシンに4°C下で1分間光(>540 nm)を照射することにより、メタロドプシンIIに変換させた。メタロドプシンIIを、精製した種々の $G_{\beta\gamma}$ 標品、大豆トリプシンインヒビター、CHAPS、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ と混合して反応させた。cytosolic  $G_{\beta\gamma}$ を用いた反応においては、これと等モルの網膜から精製した $G_{\beta\gamma}$ を混合して反応を行なった。反応は、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ とメタロドプシンIIの混合溶液を反応チューブに加えることにより開始し、25°Cにて保温した。反応開始から20分後に5%(w/v)の活性炭を含む50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ を反応チューブに加え、充分に混合することにより反応を停止した。続いて $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ の加水分解によって生じた遊離の $^{32}\text{P}_i$ を含む上清を回収した。用いた条件下では、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ の水解量は反応開始から20分間は、ほぼ直線的に上昇したので、縦軸は水解反応速度で示した。

C12:0- $G_{\beta\gamma}$ の含有率の上昇に伴い、その速度は減少した。さらに、C12:0- $G_{\beta\gamma}$ の GTPase 活性は C14:0- $G_{\beta\gamma}$ より一桁も低いと推定された。以上より、第一の疑問に対する答えとして、トランスデューションがシグナル伝達という機能を果たす際に  $G_{\beta\gamma}$ の N-アシル基は必要不可欠であることを明らかにすることができた。さらに、第二の疑問に対して、 $G_{\beta\gamma}$ アイソフォームはそれぞれ、機能的に不均一な光シグナル伝達・増幅特性を持つことを強く示唆する結果を示すことができた。 $G_{\beta\gamma}$ の N-アシル基が GTP-turnover 速度に影響を及ぼす原因としては複数の可能性が考えられる。しかしながら、 $G_{\beta\gamma}$ への  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  結合反応速度は  $G_{\beta\gamma}$ の N-アシル基によって大きな影響は受けないことと、先行研究の結果を併せて考えると、一旦解離した $\alpha \cdot \beta\gamma$ サブユニットの再会合、あるいはこのステップとほぼ同時に起こる脂質膜 (活性化ロドプシン含む) への結合に対して  $G_{\beta\gamma}$ の N-アシル基構造が強い効果を及ぼすと考えられる。