

# 論文審査の結果の要旨

氏名 橋本 祐一

桿体視細胞 G 蛋白質トランスデューシン $\alpha$ サブユニット ( $G_{t1\alpha}$ ) の N 末端は、不均一な脂肪酸 (C12:0 · C14:0 · C14:1 · C14:2) によって N-アシル化されている。ロドプシンが受容した光シグナルを伝達・増幅する際に、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  $G_{t1\alpha}$  の N-アシル基は重要な役割を果たすと考えられるが、その生理的意義は不明である。そこで論文提出者は、 $G_{t1\alpha}$  の N 末端脂肪酸の構造と  $G_{t1\alpha}$  の機能との相関に関して次の 2 点に注目して研究を行なった。1)  $G_{t1\alpha}$  の N-アシル基はトランスデューシンの機能にどのような役割をもつか。2) N 末端構造が異なる  $G_{t1\alpha}$  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  $G_{t1\alpha}$  の調製が必須である。そこで、調製が困難な  $G_{t1\alpha}$  に代えて  $G_{t1\alpha}/G_{i1\alpha}$  キメラ (以下  $G_{vi\alpha}$  と表記) を用い、N-ミリスチル化  $G_{vi\alpha}$  の調製をまず試みた。 $G_{vi\alpha}$  を Sf9 細胞に発現させ、その水溶性画分から  $G_{vi\alpha}$  を高純度に精製した。精製  $G_{vi\alpha}$  (cytosolic  $G_{vi\alpha}$  と表記) の N 末端構造を分析すると、N 末端未修飾型 (N 末端は Gly) であった。次に、膜画分から  $G_{vi\alpha}$  の可溶化を試みたが、可溶化されなかった。そこで、 $G_{\beta 1\gamma 1}$  を共発現させたところ、 $G_{vi\alpha}$  は大部分が膜画分に発現したため CHAPS により可溶化し、 $G_{\beta 1\gamma 1}$  との三量体として高純度に精製された (membrane  $G_{vi\alpha}$  と表記)。そこで、membrane  $G_{vi\alpha}$  の N 末端構造を定量的に分析し、C14:0 と C12:0 によって不均一に N-アシル化され、両者のモル比は 9:1 であることを明らかにした。この結果は、Sf9 細胞の NMT が C14:0-CoA のみならず C12:0-CoA も基質とすることを示している。そこで論文提出者は、発現培地の組成を換えれば  $G_{vi\alpha}$  の N-アシル基組成を制御できると考え、 $G_{vi\alpha}$  発現培地に C14:0 を添加し、CHAPS 可溶化画分に含まれる C12:0- $G_{vi\alpha}$  量をイムノブロット解析により推定した。その結果、C12:0- $G_{vi\alpha}$  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 $\alpha$ の含有率は上昇した。よって、C12:0 あるいは C14:0 を G $\alpha$ 発現培地に添加すれば、Sf9 細胞に発現する C12:0-G $\alpha$ 量を変え得ることが判った。そこで、大量の培養液（各々 2~6L）から数種の membrane G $\alpha$ 標品を調製して N 末端構造の分析を行い、C12:0-G $\alpha$ の含有率が互いに異なる複数の G $\alpha$ 標品を得た。この成果によって、N-アシル基が G 蛋白質 $\alpha$ サブユニット (G $\alpha$ ) 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、Rh\*が触媒する steady-state GTP 水解反応速度を、種々の G $\alpha$ 標品について測定した結果、cytosolic G $\alpha$ は、網膜 G $\beta_1\gamma_1$  存在下においても GTP 水解速度 (GTP-turnover 速度) は非常に遅かった。一方、複数の G $\alpha$ 標品の中で、C14:0-G $\alpha$ が最も速い GTP-turnover 速度を示し、精製標品に含まれる C12:0-G $\alpha$ 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 $\alpha$ の GTPase 活性は C14:0-G $\alpha$ 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、トランスデュースインがシグナル伝達という機能を果たす際に G $\alpha$ の N-アシル基は必要不可欠であることを明らかにした。さらに、第二の疑問に対して、G $\alpha$ 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した。

以上のように、論文提出者は本研究において、N 末端未修飾型 G $\alpha$ および N 末端脂肪酸組成の異なる複数の N-アシル化 G $\alpha$ の調製・分析方法を確立し、N-アシル基構造が G 蛋白質の機能に大きな影響を及ぼすことを初めて明らかにした。なお、本論文は松田孝彦氏・松浦善治氏・芳賀達也氏・深田吉孝氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行なったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。