

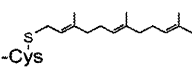
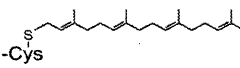
## 論文内容の要旨

### Physiological Role of Selected Farnesylation of Photoreceptor G Protein $\gamma$ Subunit (視細胞トランスデュースイン $\gamma$ サブユニットにおけるファルネシル化の生理的意義)

葛西 秀俊

G 蛋白質を含む様々な情報伝達蛋白質は C 末端システイン残基がイソプレニル化(ファルネシル化またはゲラニルゲラニル化)およびカルボキシルメチル化されている。これらの修飾脂質基は膜アンカーとして働くだけでなく、蛋白質の機能発現に必須である。イソプレニル化蛋白質は C 末端にコンセンサス配列 CAAX motif (C;システイン, A;脂肪族アミノ酸)を持ち、X のアミノ酸残基に従ってファルネシル基またはゲラニルゲラニル基のどちらがシステイン残基に付加されるかが決定される(表 1)。単量体 G 蛋白質において、Ras および Rap2A はファルネシル化されており、Rho および Rab ファミリーに属する蛋白質群はゲラニルゲラニル化されている(表 1)。特に Ras のファルネシル化は形質転換能に必須であることが知られて

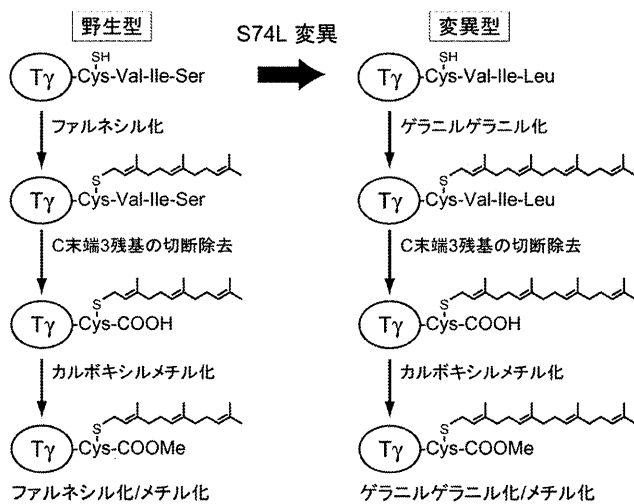
表1 イソプレニル化蛋白質

	CAAX motif	G 蛋白質		その他	
		三量体	単量体		
ファルネシル化 (carbon-15) 	X = Ser	T $\gamma$ (rod)	Ras	ロドプシンキナーゼ	
	Met	G $\gamma$ 8 (cone)	Rap2A	cGMP-PDE $\alpha$	
	Ala	G $\gamma$ 11		核ラミン	
	Gln			酵母接合因子	
ゲラニルゲラニル化 (carbon-20) 	Leu	G $\gamma$ 2	G $\gamma$ 10	Rho	cGMP-PDE $\beta$
	Phe	G $\gamma$ 3	G $\gamma$ 12	Rac	
		G $\gamma$ 4	G $\gamma$ 13	Rai	
		G $\gamma$ 5		Rab	
		G $\gamma$ 7			
		G $\gamma$ 8 (olf)			

ており、医学的・薬理的に抗がん剤のターゲットとして注目されている。また Rab のゲラニルゲラニル化は、その制御因子 RabGDI との相互作用に重要な役割を担っていることが結晶構造解析から

明らかとなっている。三量体 G 蛋白質においてもイソプレニル基の使い分けがみられ、視細胞 G 蛋白質トランスデューシン[ $T\alpha/T\beta\gamma$ (桿体)、 $Gt2\alpha/G\beta3\gamma8$ (錐体)]の $\gamma$ サブユニットはファルネシル化されている一方、他の組織において発現している多くの $\gamma$ サブタイプはゲラニルゲラニル化されている(表 1)。トランスデューシンは光情報伝達の中心的役割を担っており、視細胞特異的な $\gamma$ サブユニットのファルネシル化は視細胞の光応答や順応特性に深く関与していると推定される。実際、組換え蛋白質を用いた *in vitro* における生化学的解析の結果、人工的にゲラニルゲラニル化した  $T\beta\gamma$  はファルネシル化(野生型)  $T\beta\gamma$  と比較して、膜への結合力が増大するばかりでなく、 $T\alpha$  への親和性および  $GTP\gamma S$  の結合活性を顕著に促進した。このように、トランスデューシンの機能的特徴は修飾脂質の構造に大きく依存しているながら、その光情報伝達に関わる生理的意義および重要性については長く謎に包まれている。

本研究では、 $T\gamma$  のファルネシル化シグナル配列 CVIS をゲラニルゲラニル化配列 CVIL に置換した(S74L 変異、図 1) 遺伝子改変マウスを作成し、視細胞において  $T\gamma$  がファルネシル化されていることの生理的意義を検証した。イソプレニル化蛋白質は翻訳後のプロセッシングによって、CAAX motif の AAX 残基は特異的なプロテアーゼ RCE1 によって切断除去される。このノックインマウスの場合においても一連のプロセッシングの結果、S47L 変異を導入したアミノ酸残基 VIS および VIL は切断されると予想される。従って、



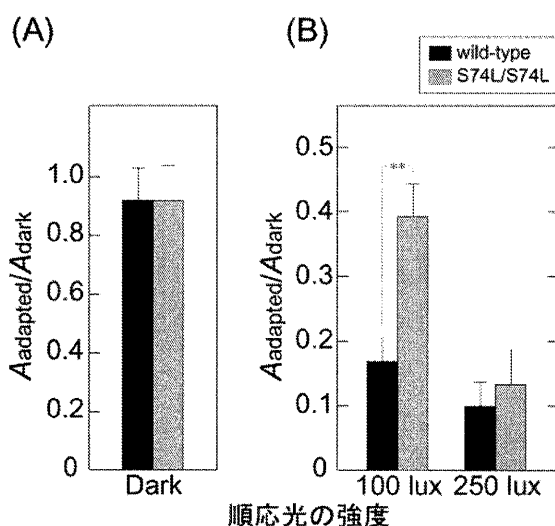
【図 1】  $T\gamma$  の翻訳後のプロセッシング

ノックインマウスにおいて成熟  $T\gamma$  は、野生型と比較してアミノ酸配列は全く同一であり、C 末端の修飾脂質基のみがファルネシル化からゲラニルゲラニル基に置換されていることになる(図 1)。これが遺伝子改変マウスの極めてユニークな点であり、この特徴によって以下に述べる解析で得られた表現型を全て C 末端の修飾脂質基の違いのみに帰属することが可能である。

まず、網膜に存在する様々な蛋白質の発現量を、ウエスタンブロット法によって野生型マウスと変異型マウスとの間で比較した。その結果、光情報伝達に関わる主な蛋白質群の発現量は、S74L 変異によって変化していないことを確認した。次に、マウス視細胞外節膜より  $T\gamma$  を単離し、C 末端修飾脂質基の構造を明らかにした。野生型トランスデューシンは光照射した視細胞外節膜に  $GTP\gamma S$  を添加することによ

て水溶性画分より比較的高純度で回収することができた。この画分より T $\gamma$  を逆相カラムを用いて単離し、質量分析を行った結果、ファルネシル化/メチル化 T $\gamma$  の計算分子量とよく一致した。ところが、変異型マウスにおいては、GTP $\gamma$ S 添加によってトランスデューシンを回収することはできなかった。そこで、T $\beta\gamma$  サブユニットと結合し、水溶性画分に移行させる性質を持つホスデューシンを外節膜に添加することを試みた。その結果、変異型 T $\beta\gamma$  サブユニットの単離に成功し、ゲラニルゲラニル化/メチル化されていることを確認することができた。この生化学的解析の結果は、変異型 T $\beta\gamma$  の視細胞外節膜への親和性が、野生型と比較して顕著に増大していることを示唆している。

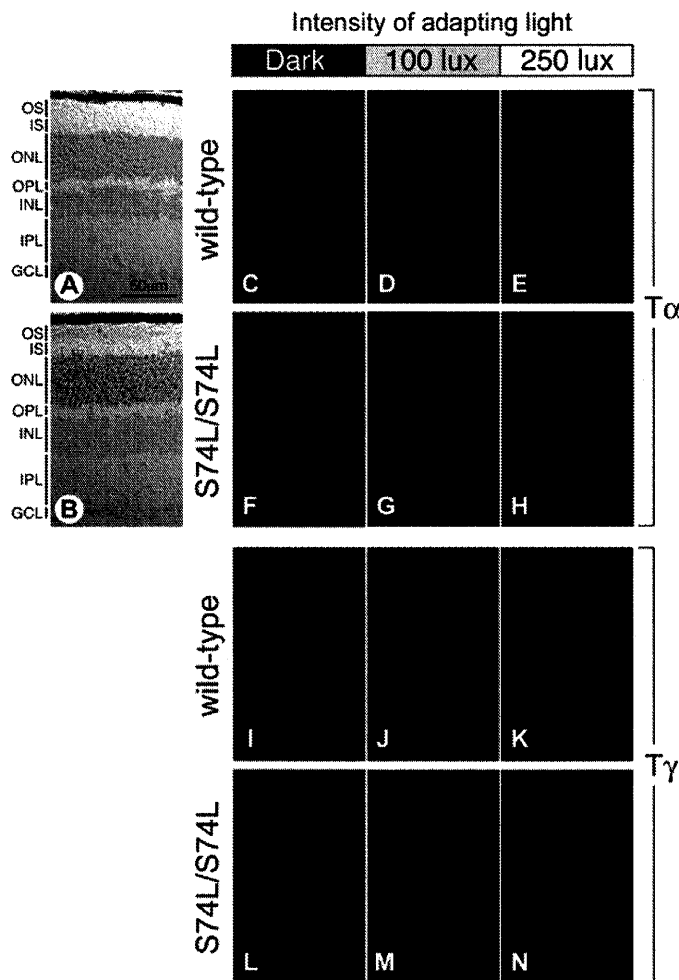
視細胞の光情報伝達は、高度な増幅機構によって 1 光子をも検出できると同時に、極めて幅広い強度の光刺激に順応して適切に応答するという順応特性を示す。T $\gamma$  の生化学的性質の違いが、視細胞における光情報伝達特性に与える影響を電気生理学的に検証した。まず暗順応状態における種々の強度の光刺激に対する単一視細胞の応答を吸引電極法によって記録した。意外なことに、野生型と変異型マウスとの間で光感度に有意な差は認められず、単一光子レベルにおいても光応答の活性化・回復過程および増幅効率に大きな違いは観察されなかった。これらの結果は、T $\gamma$  の修飾脂質基の鎖長の違いは、光情報伝達の素過程には大きな影響を与えないことを示唆している。次に、視細胞の順応特性を網膜電図 (electroretinogram, ERG) を記録することによって検証した。100 lux の順応光を照射前後に網膜の光応答を記録した結果、野生型マウスの光応答の増幅効率は暗順応状態の 15% にまで減弱 (明順応) したのに対し、変異型マウスにおいてはこの減弱が 40% にとどまった (図 2 B, 100 lux)。ところが 250 lux の順応光の照射後は、野生型および変異型マウスいずれにおいても、増幅効率が暗順応状態の 10% 程度にまで減少した (図 2 B, 250 lux)。



【図 2】 変異型マウスの順応特性。

網膜電図 (ERG) より得られた視細胞由来の構成波 (a-wave) を解析することによって、光シグナルの増幅定数  $A$  を算出し、順応前後で比較した ( $A_{\text{adapted}}/A_{\text{dark}}$ )。 (A) 順応光を照射しなかった対照実験。増幅定数の若干の低下が見られるが ( $A_{\text{adapted}}/A_{\text{dark}} = 0.9$ )、これは ERG 測定のための刺激光により明順応したと考えられる。 (B) 100 lux および 250 lux の順応光を照射した前後の増幅定数の変化。変異型マウスにおいて、100 lux の光条件下で、増幅効率の減弱 (明順応) の顕著な抑制が観察された。

変異型マウスにおける明順応(100 lux)の抑制の分子メカニズムを探るため、 $T\alpha \cdot T\beta\gamma$ の光依存的な視細胞内の局在変化を免疫組織化学的に検証した(図3)。野生型・変異型マウスいずれにおいても、 $T\alpha \cdot T\beta\gamma$ ともに暗順応状態では外節に存在していた(図3 C, F, I, L)。しかし、野生型マウスにおいては100 lux および 250 lux の光照射に伴い  $T\beta\gamma$ は内節への顕著な移動が観察された(図3 J, K)。一方、変異型マウスにおいては、いずれの光条件においても  $T\beta\gamma$ の細胞内移動が著しく抑制されていた(図3 M, N)。 $T\alpha$ については、野生型・変異型マウスともに光照射に伴う局在変化は同様であった。つまり、100 lux の順応光の照射後においては  $T\alpha$ は外節にとどまり(図3 D, G)、250 lux においては内節への局在変化が観察された(図3 E, H)。おそらくこのために250 lux の光照射後は、ERG 解析における増幅効率が野生型・変異型マウスともに同程度にまで減少したものと考えられる(図2 B, 250 lux)。一方、100 lux の光照射後、野生型マウスにおいてはファルネシル化  $T\beta\gamma$ が内節へ移動することによって、外節に存在する  $T\alpha$ の活性化効率を減少させ、その結果、光シグナルの増幅効率が減弱(明順応)したものと考えられる。ところが変異型マウスにおいては、ゲラニルゲラニル化  $T\beta\gamma$ と視細胞外節膜との結合力が増強し、外節から内節への光依存的な細胞内移動が困難となり、明順応が著しく抑制されたものと考えられる。以上の結果より、 $T\gamma$ ファルネシル基は  $T\beta\gamma$ の光依存的な細胞内移動を促進し、この効果により視細胞の光シグナル感度が制御されていることが考えられた。



【図3】 光照射に伴うトランスデューシンの局在変化。(A, B)網膜切片の微分干渉像。変異型マウス(B)の網膜および視細胞の形態は野生型(A)と比較して異常はなく、正常な層構造を形成していた。(C-N) $T\alpha$ の光照射依存的な細胞内移動は、野生型・変異型マウスともに同様であった(C-H)。しかし、変異マウスにおいて、 $T\beta\gamma$ の細胞内移動は著しく抑制されていた(L-N)。