

論文審査の結果の要旨

氏名 葛西 秀俊

蛋白質のイソプレニル化（ファルネシル化またはゲラニルゲラニル化）は、G 蛋白質をはじめとする様々な情報伝達蛋白質に見出される翻訳後修飾である。修飾イソプレニル基は、蛋白質を脂質二重膜につなぎとめる膜アンカーとして働くだけでなく、蛋白質間の相互作用を介したシグナル伝達の制御因子としても機能することが知られている。イソプレニル化シグナル配列として、CAAX motif (C;システイン、A;脂肪族アミノ酸) と呼ばれる配列が蛋白質 C 末端に存在し、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いずれかが CAAX motif 中のシステイン残基に付加される。三量体 G 蛋白質の γ サブユニットはイソプレニル化され、サブタイプ間においてファルネシル基とゲラニルゲラニル基の使い分けがみられる。すなわち、視細胞 G 蛋白質トランスデューシン [T α /T β γ (桿体に発現)、Gt2 α /G β 3 γ 8 (錐体に発現)] の γ 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大部分の γ サブタイプはゲラニルゲラニル化されている。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、*in vitro* におけるトランスデューシンの機能的特徴は修飾脂質基の構造に大きく依存している。これらのことから論文申請者は、視細胞特異的な T γ 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し、その生理的意義の解明に向けてノックインマウスを用いたアプローチを行った。

論文申請者は、T γ のファルネシル化配列 CVIS をゲラニルゲラニル化配列 CVIL に置換したノックインマウス(以下、S74L マウスと呼ぶ)を作成した。まず、生化学的手法により S74L マウス T γ の C 末端修飾脂質基の構造を明らかにした。マウス網膜より T γ を単離し、逆相 HPLC と質量分析を用いて分析した結果、野生型 T γ はファルネシル化、S74L 変異型 T γ はゲラニルゲラニル化されていることが明らかとなった。次に、S74L マウス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比較した。その結果、光情報伝達に関わる主要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が判った。

視細胞の光情報伝達は、高度に発達した増幅機構を持つと同時に、極めて幅広い強度の背景光に対する順応特性を持つ。論文申請者は S74L マウス視細胞における光情報伝達特性を電気生理学的に調べた。まず暗順応状態において種々の強度の光刺激を与え、単一視細

胞からの電気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 S74L マウスとの間で、光応答の活性化・回復過程および光シグナルの増幅効率に有意な違いは認められなかった。この結果は、T γ イソプレニル基の鎖長の違いは、暗順応状態における光応答特性に大きな影響を与えないことを示唆している。次に、S74L マウスに背景光を照射した際の順応特性を、網膜電図により解析した。その結果、100 lux の背景光を 10 分間照射した時に野生型マウスでみられる光シグナルの増幅効率の低下（明順応）が、S74L マウスでは起こりにくくなっていることがわかった。

視細胞における順応機構には、多くの分子メカニズムが働いている。長時間（数分以上）の背景光照射に対する順応メカニズムとして、トランスデューシンの局在変化が光シグナルの増幅効率を調節するというモデルが提唱されている。順応光照射によってトランスデューシンが外節から内節方向へ視細胞内を移動する結果、外節におけるトランスデューシン濃度が減少し、シグナル増幅効率が低下する、つまり明順応が引き起こされるというモデルである。S74L マウスにおいて明順応が抑制されていたことに対する分子基盤を探るため、論文申請者は、順応光の照射前後におけるトランスデューシンの視細胞内の局在を免疫組織化学的に解析した。100 lux の順応光を 10 分間照射したところ、野生型マウスの T $\beta\gamma$ は外節から内節方向へ局在変化した。S74L マウスにおいては T $\beta\gamma$ の細胞内移動が著しく抑制されていた。一方、この順応条件においては、野生型と S74L マウスの間で T α の局在には違いは認められなかった。これらの結果より、野生型マウスにおいては、順応光照射に伴ってファルネシル化 T $\beta\gamma$ が内節方向へ移動した結果、外節における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 S74L 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た結果、T $\beta\gamma$ の光依存的な外節から内節への細胞内移動が阻害され、明順応が抑えられたものと考えられる。

以上の解析によって、視細胞特異的な T γ のファルネシル化は、トランスデューシンの光依存的な局在変化および明順応を制御する上で極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。本論文は、蛋白質に結合した脂質修飾の分子的特徴を、細胞の機能的特徴と結びつけた点において、非常にユニークな研究成果であり、高い学術的価値が認められる。

なお、本論文は饗場篤・中尾和貴・中村健司・勝木元也・Wei-Hong Xiong・King-Wai Yau・今井啓雄・七田芳則・岡野俊行・深田吉孝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った研究成果であり、論文提出者の寄与が十分であると判断される。従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。