

論文内容の要旨

視細胞トランスデューシン γ サブユニットにおけるファルネシル基の作用標的解析

Molecular Targets of the Farnesyl Moiety of Photoreceptor G-Protein γ subunit

片田江 舞子

視細胞特異的な三量体 G 蛋白質であるトランスデューシンは、視細胞外節膜において光シグナルの増幅を担う。トランスデューシンは、 α サブユニット ($T\alpha$, 43 kDa)、 β サブユニット ($T\beta$, 35 kDa) および γ サブユニット ($T\gamma$, 8 kDa) から構成されてされている。 $T\alpha$ にはグアニンヌクレオチド (GDP あるいは GTP) が結合しており、 $T\beta$ と $T\gamma$ は生理条件下において複合体 ($T\beta\gamma$) を形成している。 $T\gamma$ の C 末端は、S-ファルネシル化および α -カルボキシルメチル化されており、これらの翻訳後修飾はトランスデューシンの分子間相互作用および機能発現に必須であることが示されている。一般的に、蛋白質に結合した修飾脂質は、その疎水的性質から蛋白質を膜に留めておくアンカーとして機能すると考えられている。一方で、修飾脂質が蛋白質-蛋白質間の相互作用を制御する役割をもつことが報告されている。例えば、 $T\gamma$ の C 末端ファルネシル化は三量体 $T\alpha/T\beta\gamma$ の形成、すなわちサブユニット間相互作用に必須である。また、光受容体ロドプシンの活性化に伴って $T\alpha$ に結合した GDP は細胞質中の GTP と交換されるが、この GDP/GTP 交換反応には $T\gamma$ のファルネシル化が必須である。しかしながら、 $T\gamma$ のファルネシル基が $T\alpha/T\beta\gamma$ 分子内で占める位置をはじめ、ファルネシル基が分子間の相互作用を制御する機構については未だ明らかとされていない。本研究では、光シグナル伝達過程におけるファルネシル基の作用標的を明らかにするため、光標識活性をもつファルネシルアナログを導入した $T\beta\gamma$ をもちいて修飾脂質の標的分子の解析を行なった。

まず、光親和標識活性をもつTβ_γを作製するために、酵素反応による*in vitro*修飾経路を確立した。γサブユニットのC端のシステイン残基におけるイソプレニル化およびメチル化は、以下の3段階の酵素反応を経て完了する(図2)。(i) イソプレニル転移酵素 (Farnesyltransferase: FTase、またはGeranylgeranyltransferase: GGTase) によって、ファルネシルピロリン酸 (C15) またはゲラニルゲラニルピロリン酸 (C20) がC末端CAAX配列のシステイン残基に転移される。(ii) イソプレニル化された蛋白質の末端3残基AAXは、プロテアーゼ (Rce1; ras converting enzyme 1) によって切り出される。(iii) C末端に新たに露出したシステイン残基のカルボキシル基が、メチル基転移酵素 (Icmt; isoprenyl carboxyl methyl transferase) によって、S-アデノシルメチオニンを供与体としてメチル化される。これらのプロセスを触媒する酵素を用いてファルネシル骨格上にアジド型光反応性標識基をもつアナログ

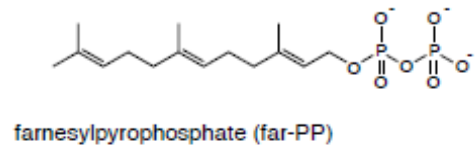
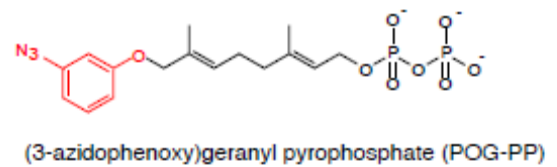


図1. POGピロリン酸とファルネシルピロリン酸の構造

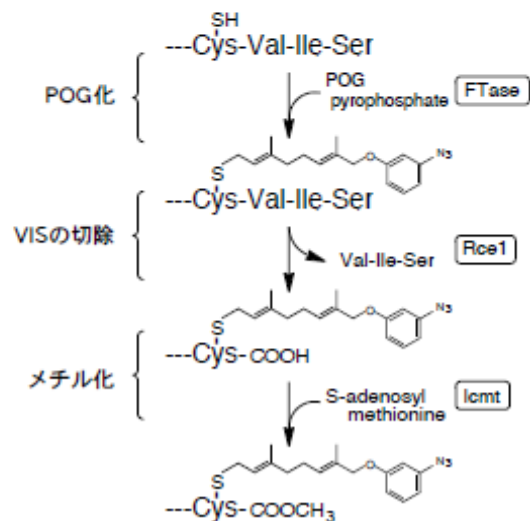


図2. POG導入のプロセッシング反応

(3-azidophenoxy)geranyl pyrophosphate (POG-PP、図1) およびメチル基を導入した光親和性Tβ_γ (POG-Tβ_γ-OMe) を効率よく作製することに成功した。作製したPOG-Tβ_γ-OMeが、G蛋白質としての機能を保持しているか否かを確認するために、POG-Tβ_γ-OMeのTαへのGTP_γS結合促進活性を測定した結果、POG-Tβ_γ-OMeはTαのGDP/GTP交換反応を促進する活性を示した。これより、光親和標識ファルネシルアナログであるPOGによって修飾されたTβ_γは、G蛋白質としての活性を有する分子種であることが確認された。

次に、POG-Tβ_γ-OMe をもちいて、POGの先端とその近傍の構造を架橋固定することによりPOG基の作用標的の同定を試みた。具体的には、POG-Tβ_γ-OMeを含む分子複合体にPOGの吸収波長である300 nmの紫外光を照射した後に、架橋生成物をウエスタンブロット法により解析した。まず、POG-Tβ_γ-OMe単独で光親和標識を行なったところ、抗γ抗体および抗β抗体によって認識される43 kDaのT_γ-Tβ架橋物が観察され、この結果からTβ_γサブユニットにおいてはT_γのファルネシル基が

Tβの近傍に位置することが示唆された。

また、Tαと Tβγが会合した三量体

Tα/POG-Tβγ-OMe における光親和標識

では、Tγ-Tβ架橋物に加えて、新たに抗γ抗体および抗α抗体によって認識される

45 kDa の Tγ-Tα架橋物が検出された。

Tβγの構造解析ではTβのプロペラ構造内の

‘ファルネシルポケット’にγサブユニット

のファルネシル基が位置する可能性が

示されており、今回の結果と総合すると

三量体 Tα/Tβγにおいては、Tαと Tβとの

サブユニット間における相互作用部位に

Tγのファルネシル基が位置すると推測

される。

光受容体ロドプシンが光シグナルを受けて活性化ロドプシン (Rh*)になると、

Tα-GDP/Tβγは Rh*に結合して複合体 (Rh*/Tα-GDP/Tβγ) を形成する。このとき、Tαの GDP/GTP

交換反応が起こり Tα-GTP および Tβγは Rh*から遊離し、それぞれのエフェクター分子や調節因子

と相互作用する。Rh*はさらに別の Tα-GDP/Tβγと会合して上記のサイクルをくり返すことにより

入力した光シグナルは数百倍に増幅される。このように、光シグナルの増幅過程において Tβγが相

互作用する相手分子は変化する。そこで、Rh*およびトランスデューシンによる光シグナル増幅の

過程における Tγの修飾脂質の作用標的を明らかにするため、POG-Tβγ-OMe、Tα、および Rh*を含

む ROS 膜を *in vitro* で再構成し光親和標識を行なった。その結果、Rh*/Tα-GDP/Tβγ複合体にお

いて、Tγの POG 基が Rh*および低分子成分 X と架橋固定されることを新たに発見した (図 3)。

さらに、GTP を添加することにより Rh*から Tα-GTP および POG-Tβγ-OMe を遊離させると、

Tγ-Rh*架橋物および Tγ-X 架橋物は殆ど消失した。これらの結果は、受容体と G 蛋白質との会合・

解離に応じて、ファルネシル基の作用標的が変化することを示しており、特に、Rh*に Tα-GDP/Tβγ

が結合する条件において Tγ-X 架橋物が観察されたことは、ファルネシル基と X との相互作用が Rh*

と Tα-GDP/Tβγとの結合に機能的役割を果たしている可能性を示唆している。そこで、光活性化し

たロドプシンとトランスデューシンの会合状態における修飾脂質の役割を明らかにするため、低分

子量成分 X の分子種の特定を試みた。

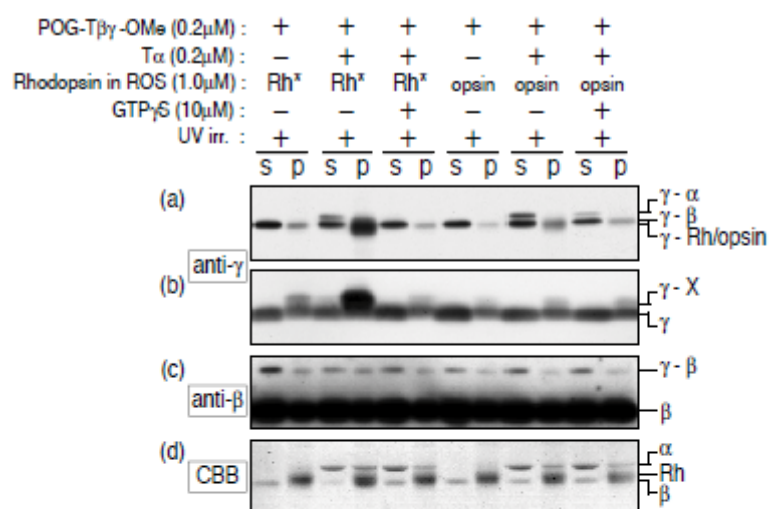


図3. ロドプシン存在下における光架橋実験

POG-Tβγ-OMe にTα (終濃度 0.2 mM)、活性化したロドプシン (メタロドプシンII, Rh*と表記) を含むROS膜、またはオプシンを含むROS膜を混合し、4℃にて30分間静置した。300nmの紫外光を4℃にて45秒間×3回 (60秒間隔) 照射した後に遠心により水溶性画分 (S) と膜画分 (P) に分画した。SDS-PAGEにより蛋白質を泳動し、抗γ抗体 (パネル a: 30-50kDaの領域、およびパネル b: 0-10kDaの領域)、および抗β抗体 (パネル c: 30-50kDaの領域) によるウエスタンブロット解析を行なった。パネル d: アクリルアミドゲルのCBB染色像。

T γ -X架橋物が膜画分に特異的に検出されたこと、およびXが低分子物質であることから、XはROS膜を構成する脂質成分である可能性が考えられるため、脂質分解酵素（ホスホリパーゼA₂およびスフィンゴミエリナーゼ）に対するT γ -X架橋生成物の感受性を調べた。その結果、T γ -X架橋物はホスホリパーゼA₂によって酵素処理した場合にのみ検出されなくなったことから、修飾脂質が相互作用したXはROS膜内のグリセリン脂質であると考えられた。続いて、リン脂質の分子種をさらに絞り込むため、5種類のリン脂質プローブをもちいてT γ -X架橋物のELISA解析を行なったところ、T γ -Xは、ホスファチジルエタノールアミン（PE）およびホスファチジルセリン（PS）に対するリン脂質プローブによって特異的に認識された。一方、ホスファチジルコリン、PIP₂、およびスフィンゴミエリンに対する脂質プローブではT γ -Xは殆ど認識されなかった。これらの結果から、Rh*とT α -GDP/T β γが複合体を形成する際に、T γ のファルネシル基がROS膜内のPEやPSに作用することによってRh*とT α -GDP/T β γとの相互作用が制御される可能性が示された。

以上をまとめると、光シグナル伝達において以下のファルネシル基の標的分子モデルが考えられる（図4）。(i) トランスデューシンが膜に結合存在した状態では、ファルネシル基はT β のファルネシルポケットに位置する。(ii) ロドプシンが光を受容して活性化すると、トランスデューシンはロドプシンと複合体を形成する。このとき、ファルネシル基はT β に加えて外節膜のグリセリン脂質であるPEやPSと相互作用する。おそらく、T γ のファルネシル基はロドプシンと脂質膜との境界面に位置し、このときロドプシンを取り巻くPEやPSと相互作用すると推定される。(iii) 続いて、T α のGDP/GTP交換反応に伴って、GTP型T α とT β γがそれぞれロドプシンから解離するとT γ のファルネシル基とPE、PS、およびロドプシンとの相互作用は消失し、T β との相互作用が残る。(iv) GDP結合型T α とT β γが会合した三量体（水溶性状態）においては、T γ のファルネシル基はT α 、あるいはT β と相互作用する。こ

のようにファルネシル基が標的とする分子は、光シグナル伝達の各ステップにおいて変化し、ファルネシル基が動的な制御因子として機能している可能性が考えられた。

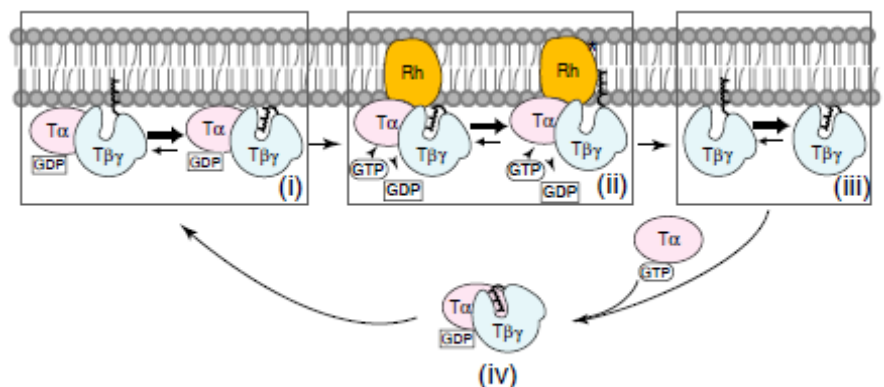


図4. 光情報伝達経路におけるファルネシル基の作用機構モデル