

論文審査の結果の要旨

氏名 片田江 舞子

シグナル伝達に関与する蛋白質の多くは、イソプレノイド（ファルネシルまたはゲラゲラニル）による修飾を受けている。蛋白質に結合した脂質は、その疏水的性質によって蛋白質を膜に留めておくアンカーとして機能することに加えて、蛋白質-蛋白質間の結合や活性制御に必須である。視細胞特異的な G 蛋白質であるトランスデュシン ($T\alpha/T\beta\gamma$) の γ サブユニット ($T\gamma$) の C 末端は、ファルネシル基およびメチル基によって修飾されており、 $T\alpha/T\beta\gamma$ の活性制御にこれらの修飾は不可欠である。しかしながら、 $T\gamma$ のファルネシル基が $T\alpha/T\beta\gamma$ 蛋白質分子内において存在する位置をはじめ、ファルネシル基による活性制御のメカニズムは未だ不明である。したがって、蛋白質に修飾した脂質がどのようなメカニズムによってシグナル伝達経路を制御しているのかを解析することは、蛋白質の翻訳後修飾の意義を推測する上で非常に興味深い。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アプローチ法として、申請者は光親和標識活性をもつ新規のファルネシルアナログである POG を導入した $T\beta\gamma$ をもちいて修飾脂質が作用する標的分子の解析を行なった。

まず、申請者は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 (POG) によって修飾された $T\beta\gamma$ 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。さらに、メチル基を導入した光親和性 $T\beta\gamma$ (POG- $T\beta\gamma$ -OMe) を効率よく作製することに成功した。

次に、作製した POG- $T\beta\gamma$ -OMe の POG 基の先端とその近傍の構造を光親和標識によって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- $T\beta\gamma$ -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- $T\beta\gamma$ -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 $T\gamma$ - $T\beta$ 架橋物が観察され、この結果から $T\beta\gamma$ サブユニットにおいては $T\gamma$ のファルネシル基が $T\beta$ の近傍に位置することが示唆された。また、 $T\alpha$ と $T\beta\gamma$ が会合した三量体 $T\alpha$ /POG- $T\beta\gamma$ -OMe における光親和標識では、 $T\gamma$ - $T\beta$ 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 $T\gamma$ - $T\alpha$ 架橋物が検出された。 $T\beta\gamma$ の立体構造解析の結果から $T\beta$ のプロペラ構造内の 'ファルネシルポケット' に $T\gamma$ のファルネシル基が位置する可能性が示唆されており、申請者は三量体 $T\alpha$ / $T\beta\gamma$ において

は、 $T\alpha$ と $T\beta$ とのサブユニット間における相互作用部位に $T\gamma$ のファルネシル基が位置すると結論付けた。

また、光活性化したロドプシン (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 $T\gamma$ の修飾脂質の作用標的を明らかにするため、POG- $T\beta\gamma$ -OMe、 $T\alpha$ 、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、 $Rh^*/T\alpha$ -GDP/ $T\beta\gamma$ 複合体において、 $T\gamma$ 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見出した。さらに、GTP を添加することにより Rh^* から $T\alpha$ -GTP および POG- $T\beta\gamma$ -OMe を解離させると、 $T\gamma$ - Rh^* 架橋物および $T\gamma$ -X 架橋物は消失した。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^* と $T\alpha$ -GDP/ $T\beta\gamma$ が結合する条件において $T\gamma$ -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 $T\alpha$ -GDP/ $T\beta\gamma$ 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、申請者は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。

$T\gamma$ -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 膜を構成するの脂質成分である可能性が考えられた。そこで、リン脂質の分子種を特定するため、5種類のリン脂質プローブをもちいて $T\gamma$ -X 架橋物の ELISA 解析を行なったところ、 $T\gamma$ -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、 PIP_2 、およびスフィンゴミエリンに対する脂質プローブでは $T\gamma$ -X は殆ど認識されなかった。これらの結果から、 Rh^* と $T\alpha$ -GDP/ $T\beta\gamma$ が複合体を形成する際に、 $T\gamma$ 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 $T\alpha$ -GDP/ $T\beta\gamma$ との相互作用が制御される可能性が示された。

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を示し、さらにファルネシル基が作用する生体膜脂質を同定した本論文の成果は、情報伝達経路に見られる分子間相互作用メカニズムの解明に向けて重要な基盤を提供すると考えられる。

なお、本論文は萩原健一・和田昭盛・伊藤好允・梅田真郷・Patrick J. Casey・深田吉孝との共同研究であるが、論文申請者が主体となって分析および検証を行ったもので、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。