



Functional Significance of Triton X-100-insoluble Constituents in Signal Transduction System of Vertebrate Photoreceptors

妹尾, 圭司

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2001-09-21

(Date of Publication)

2015-08-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2568

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002568>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【278】

氏 名・(本 籍) 妹尾 圭司 (岡山県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (理学)

学 位 記 番 号 博ろ第63号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成13年9月21日

【学位論文題目】

**Functional Significance of Triton X-100-insoluble Constituents in
Signal Transduction System of Vertebrate Photoreceptors**

(脊椎動物視細胞の信号伝達系における
Triton X-100 不溶性成分の重要性)

審 査 委 員

主査 教授 林 文夫

教授 小野 功貴

教授 前川 昌平

教授 磯野 克己

脊椎動物視細胞の光情報伝達系は、G タンパク質仲介型細胞内情報伝達系として知られているが、光信号の忠実な細胞内 cGMP 信号への変換や、その伝達効率の調節のためにさまざまな調節機構が用意されている。こうした種々の調節機構を含めて光情報伝達系を構成するタンパク質の多くは膜結合タンパク質である。一般に、膜タンパク質の研究のためにはその可溶性が不可欠であり、通常 Triton X-100 をはじめとする非イオン性の界面活性剤が用いられてきた。しかし、細胞内にはこれらの界面活性剤に不溶性のタンパク質が多く存在しており、取扱いの困難さから界面活性剤不溶性の成分に関する研究は遅れてきた。しかし、最近になって、これらの界面活性剤不溶性の成分が様々な細胞膜の機能に重要な役割を果たしていることが明らかになり、特にカベオレラフトといった界面活性剤不溶性膜分画がにわかに注目されるに至っている。私は、視細胞の光情報伝達系でも、これまで研究されてこなかった界面活性剤不溶性の成分が何らかの重要な役割を果たしているのではないかと考え、本研究を実施した。

その結果、1) 視細胞光受容膜の Triton X-100 不溶性分画に存在する cGMP 合成酵素が同じ分画に存在する RGS9 という活性型 G タンパク質の寿命を調節するタンパク質と特異的に相互作用することを発見し、信号変換に必要な cGMP 合成と分解の両過程の間に直接的な相互作用が存在する可能性を始めて示唆することができた。また、2) 視細胞光受容膜からはラフト様の Triton X-100 不溶性膜分画 (detergent-resistant membrane: DRM) が調製できることを始めて明らかにし、さらに G タンパク質やその標的酵素である cGMP 分解酵素 (PDE) が光情報伝達の特定の段階でこの DRM 上に凝集したり離散することを発見した。界面活性剤不溶性膜分画やその上に局在するタンパク質が信号伝達反応の場として重要な意味を持っている可能性を始めて示唆することができた。

まず第 1 章では、ROS の界面活性剤不溶性分画中に cGMP 合成酵素 (guanylate cyclase : GC) 結合タンパク質を検索し、新規な GC 結合タンパク質を発見した。GC が界面活性剤不溶性であることは良く知られているが、アミノ酸配列から予測すると一回膜貫通型タンパク質で、界面活性剤不溶性は予想されない。そこで視細胞外節の Triton X-100 不溶性分画中でこのタンパク質と相互作用するタンパク質を検索した。方法としては、膜オーバーレイ法を採用した。Triton X-100 不溶性分画に含まれるタンパク質を 2 次元電気泳動法によって分離し、PVDF 膜に転写した後、比較的弱い界面活性剤共存下に精製 GC をオーバーレイした。結合した GC は GC ペプチド特異抗体を用いて検出した。その結果、55 kDa の未知のタンパク質が GC と選択的に結合し、その活性を阻害することが明らかになった。このタンパク質はほどなく G タンパク質の活性型寿命を調節するタンパク質である RGS9 (regulator of G-protein signaling 9) であることが判明した。この結果は、光依存的に cGMP 濃度を変化させる cGMP 分解系と cGMP 合成系のタンパク質間に直接的な相互調節機構が存在することを強く

示唆した。さらに、大腸菌を用いて RGS9 の変異体を発現させ、それらの GC 結合能を検討したところ、これまで機能の不明であった RGS9 の N 末端領域が GC との結合に関与していることが明らかになった。

第 2 章では、視細胞の光受容膜で発見したラフト様膜分画について検討した。タンパク質が界面活性剤に不溶となる仕組みとしては、タンパク質間相互作用によって細胞骨格タンパクなどと結合することが考えられてきたが、近年、膜中に“DRM” (detergent-resistant membranes) と呼ばれる Triton X-100 不溶性の領域が存在することが明らかになり、シグナルを効率よく伝達する場を提供する仕組みとして注目されるようになった。そこで、視細胞にも DRM が存在し、光情報伝達に重要な働きをしているのではないかと考え、視細胞外節での DRM の調製を試みた。その結果、他の細胞で見られる DRM と同様に、コレステロールやガングリオシド (GD3) を比較的多く含む膜分画を得ることができた。この DRM の光情報伝達系における役割を明らかにするために、光信号変換の諸段階でのシグナルタンパク質の DRM への分布を調べた。視細胞の G タンパク質であるトランスデュースインは暗状態では Triton X-100 可溶性だが、そのかなりの部分が光刺激で DRM へ移行した。さらに光とともに GTP の非水解性アナログである GTP γ S を与え、トランスデュースイン α サブユニット上でのヌクレオチド交換を起こし、トランスデュースインを活性化させると、トランスデュースインは再び可溶性分画に移行することが明らかになった。これと対照的に、トランスデュースインの標的酵素である PDE は暗状態では Triton X-100 可溶性だが、活性化されるとほとんどが DRM へ移行するという結果が得られた。これら以外のタンパク質の分布に関しては光刺激および GTP γ S による顕著な差は見られなかった。さらに、GC、RGS9、G β_{SL} (RGS9 と複合体を作って、RGS の活性を PDE 活性化と連動させる新規の G β タンパク質)、ABCR (レチノールの輸送に関与する ATP-binding cassette 輸送タンパク質)、cGMP 依存性チャンネルといった多くの光情報伝達系に関与する膜タンパク質が DRM に分布することも明らかになり、G タンパク質や PDE の DRM への移行が信号変換のプロセスに密接に関係していることが強く示唆された。また、DRM に分布する光受容体 (ロドプシン) が Triton X-100 可溶性の受容体にくらべて G タンパク質と高い親和性を持つことが示唆され、受容体と G タンパク質との相互作用のプロセスに関してもラフト様膜領域とこれらタンパク質との相互作用を考慮した新しい検討が必要であることが明らかになった。以上述べた研究の結果、視細胞においても信号伝達にラフト様膜領域が重要な働きをしていることが強く示唆される結果となった。

ラフト様膜領域とそれ以外の膜領域での諸タンパク質の相互作用を明らかにすることによって光情報変換分子機構のより深い理解が得られるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

氏名	妹尾 圭司		
論文題目	Functional Significance of Triton X-100-insoluble Constituents in Signal Transduction System of Vertebrate Photoreceptors (脊椎動物視細胞の信号伝達系における Triton X-100 不溶性成分の重要性)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	林 文夫
	副査	教授	小野 功貴
	副査	教授	前川 昌平
	副査	教授	磯野 克己
	副査		
要 旨			
視細胞の光情報変換分子機構は 3 量体型 G タンパク質が仲介する信号系の典型として最もよく研究されてきた。しかし、現時点においてもまだ十分に解明されたとは言いがたい。特に cGMP 分解酵素を迅速に不活性化する分子機構や、視細胞に特有の強力な順応機構などが未解明のままである。光信号変換系を構成する主要なタンパク質である光受容体、G タンパク質、ならびにその標的酵素である cGMP 加水分解酵素 (PDE) などは光受容膜から容易に溶出できたり、中性界面活性剤で可溶化できたりするため生化学的な研究が進み、その結果、視細胞での光 - 化学信号変換機構の大筋が明らかにされてきた。しかし、その			

反面、重要な機能を担うと考えられるいくつかのタンパク質は界面活性剤に難溶なため生化学的研究が遅れており、このことが上記のような視興奮の不活性化過程や順応機構といった光信号変換系の未解明な部分を残す理由の一つになっている。学位申請者は、視細胞光信号変換系膜タンパク質の界面活性剤不溶性成分に着目して研究を展開し、脊椎動物光信号変換分子機構研究の突破口となり得るいくつかの成果をあげている。

序章では、研究の背景および研究の目的、さらに各章で論じる研究の概要およびその意義を述べている。

第 1 章では、視興奮の回復過程で重要な役割を果たす cGMP 合成酵素 (guanylyl cyclase: GC) が中性界面活性剤に不溶である点に注目し、GC を膜に強くつなぎ止める未知のタンパク質の存在を検討した。光受容膜の中性界面活性剤不溶性分画に含まれるタンパク質を 2 次元電気泳動法で分離し、PVDF 膜上で再生処理を施した後、精製 GC をオーバーレイすることによって GC を特異的に結合するタンパク質の同定を試みた。その結果、分子量 55,000 で等電点 8 以上のタンパク質が特異的に GC に結合し、さらに GC の活性を容量作用的に阻害する能力を持つことを発見した。このタンパク質の部分アミノ酸配列を検討した結果、米国でほぼ同時に遺伝子が単離された RGS9 という視細胞特有の GTPase 活性化タンパク質 (GAP) であることが判明した。RGS9 は活性化された G タンパク質と結合し、G タンパク質の内在性 GTP 加水分解活性を高めることによって、活性型 G タンパク質の寿命を縮める働きをするとされるタンパク質である。光で活性化された cGMP 分解を停止させる

ために重要なタンパク質として注目されている。申請者の発見は、この RGS9 が G タンパク質を抑制する能力だけでなく、cGMP の回復反応も調節できる多機能タンパク質である可能性を示唆しており、光信号系に必要なパルス応答性の高さを実現するメカニズムとして、こうした不溶性膜タンパク質間の相互作用をより深く検討する必要性を示したインパクトのある成果だと考えられる。

第 2 章では、光受容膜上の中性界面活性剤難溶性膜領域についての研究成果を報告している。申請者は、光受容膜の中性界面活性剤に不溶性のタンパク質について検討する中で、視細胞中にも難溶性のタンパク質を選択的に保持する界面活性剤難溶性の膜領域が存在することを発見した。近年、ラフトと呼ばれる細胞膜上の特殊な領域の存在が広く様々な細胞生物学の分野で注目されるに至っているが、この膜領域はコレステロールや飽和度の高い脂肪酸からなるリン脂質や糖脂質を豊富に含み、Triton X-100 などの中性界面活性剤難溶性という性質を持っている。申請者は視細胞の光受容膜で認められたラフト様膜領域に G タンパク質やその標的酵素 PDE がそれぞれの活性状態に依存して集合することも発見した。さらに、この特殊な膜領域に GC や RGS9 などが豊富に存在することを確認しており、光信号変換そのものの成立にこのラフト様膜領域が重要な役割を担っていることが強く示唆された。視細胞の光受容膜はこれまで、もっぱら高度不溶和脂肪酸に富んだ流動性の高い均一な膜と考えられてきており、その膜の上を受容体や G タンパク質などがランダムに泳ぎ回って反応連鎖を構成すると考えられてきたが、申請者の発見は信号系の機能発現に重要な意味を

持つ特異的な少なくとも 2 種類以上の膜領域が存在することを始めて示したものであり、この研究分野に大きなインパクトを与えるものと考えられる。ラフト様膜領域とそれへの信号系タンパク質の集合や離散を詳細に検討することによって順応機構など未解明の問題に深い洞察を与える可能性が高い。

以上のように、本研究は、視細胞光情報変換系の分子機構を界面活性剤不溶性のタンパク質や膜領域に注目して研究したものであり、これまでの常識を覆す全く新しい観点から光受容膜上での信号変換について明らかにしたものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者、妹尾圭司は、博士（理学）の学位を得る資格があることを認める。