

Title	Biochemical Analysis of Photoreceptor Ca <sup>2+</sup> -Binding Proteins
Author(s)	松田, 信爾
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3143769">https://doi.org/10.11501/3143769</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	まつ だ しん じ 松 田 信 爾
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 3 6 5 5 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	Biochemical Analysis of Photoreceptor Ca <sup>2+</sup> -Binding Proteins (視細胞特異的Ca <sup>2+</sup> 結合タンパク質の生物化学的研究)
論文審査委員	(主査) 教授 徳永 史生  (副査) 教授 河村 悟 助教授 片岡 幹雄 助教授 倉橋 隆

#### 論 文 内 容 の 要 旨

カエル網膜から発見されたS-モジュリンは、高Ca<sup>2+</sup>濃度でロドプシンのリン酸化を阻害し、順応に関与していると考えられる。私は、カエル網膜中の新たなCa<sup>2+</sup>結合タンパク質 (s26) をコードするcDNAをクローン化した。推定されるs26のアミノ酸配列は、ビジニン(ニワトリ網膜に存在すると考えられているタンパク質)のものと同様で77%、S-モジュリンのものと同様で67%が一致していた。免疫組織化学的手法を用いてこれらのカエル網膜中での局在を調べたところ、S-モジュリンは桿体視細胞に、s26は錐体視細胞に存在することが明らかになった。S-モジュリン、s26のN末端にはミリストイル基付加シグナルがあり、脂肪酸修飾されていると考えられる。私はN末端未修飾のS-モジュリンとs26、及びN末端ミリストイル化したS-モジュリンとs26の4種をそれぞれ大腸菌の系で発現させ、精製することに成功した。N末端ミリストイル化S-モジュリン、及びs26のCa<sup>2+</sup>濃度に依存したトリプトファンの蛍光スペクトル変化を比較したところ、両者とも、約700 μMのCa<sup>2+</sup>結合定数を持つことが示された。

S-モジュリンはs26に比べて、より強く視細胞外節膜に結合することが明らかになった。N末端から173番目のアミノ酸までがs26の配列、C末端の29アミノ酸がS-モジュリンの配列を持ったキメラs26はS-モジュリンと同等の膜結合性を示した。これに対し、逆の組み合わせのキメラS-モジュリンはs26と同等の膜結合性を示した。また、C末端付近の正電荷を除去した変異S-モジュリンはs26以下の結合性しか示さなかったが、負電荷を除去したS-モジュリンでは、野生型のS-モジュリン以上の膜結合性を示した。さらに、これらのタンパク質のロドプシンのリン酸化に対する影響を調べた結果、高い膜結合性を持つタンパク質は膜結合性の低いタンパク質に比べ、より効率的にロドプシンのリン酸化を阻害した。以上の結果からS-モジュリンのC末端の正電荷は、膜への結合性を高め、それによりロドプシンのリン酸化を強く阻害すると考えられる。

S-モジュリンには2つのEF-handCa<sup>2+</sup>結合部位が存在するが、このうちの一方を不活化し、それぞれが担う役割を調べた。EF-hand2を不活化した変異体(E85M)とEF-hand3を不活化した変異体(E121M)のCa<sup>2+</sup>非結合状態でのトリプトファンの蛍光スペクトルは野生型のものと同様で一致した。このことから、変異の導入はS-モジュリンの構造を大きく破壊していないと考えられる。野生型は1分子当たり2つのCa<sup>2+</sup>を結合し、E85Mは1分子当たり1つのCa<sup>2+</sup>を結合した。これに対して、E121MはCa<sup>2+</sup>を結合しなかった。このことから、EF-hand3へのCa<sup>2+</sup>の結合がEF-hand2へのCa<sup>2+</sup>の結合に重要であると考えられる。E85Mは野生型と同等に視細胞外節膜に結合するが、ロドプシンのリン酸化は阻害しなかった。このことから、EF-hand3へのCa<sup>2+</sup>の結合はS-モジュリンの視細胞外節膜へ

の結合を引き起こし、EF-hand2 へのCa<sup>2+</sup>の結合がロドプシンのリン酸化の阻害に必要であることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

感覚に一般ある順応現象の分子機構ではカルシウム結合蛋白質が重要な働きをしていることが明らかになってきた。松田君提出の論文では視細胞内で順応に働くカルシウム結合蛋白質 S-モジュリンの大腸菌による大量発現系を確立し、カルシウム結合部位の変異体を作り、カルシウム結合と機能との関係を明らかにした。また類似蛋白質 s26 の cDNA をクローン化し、大腸菌による大量発現系を確立し、キメラ蛋白質を作って S-モジュリンとの性質の違いを明らかにした。

これらの知見は視覚の研究に、新たな視点を与えるだけでなく、一般の細胞内情報処理機構の理解にとって重要な知見である。よって松田君提出の論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。