



Title	網膜 MEKA (Phosducin) 蛋白質のトランスデューション β γ サブユニットとの結合ドメイン
Author(s)	田中, 秀和
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38991
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	田中秀和
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第11767号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	網膜MEKA(Phosducin)蛋白質のトランスデューション $\beta\gamma$ サブユニットとの結合ドメイン
論文審査委員	(主査) 教授 三木直正
	(副査) 教授 倉智嘉久 教授 高井義美

論文内容の要旨

【目的】

網膜特異的に発現しているMEKA蛋白質は、トランスデューション(transducin) $\beta\gamma$ サブユニット(T $\beta\gamma$)と一対一に結合し、そのGTPase活性を抑制する。遺伝子組換えによりMEKAの欠損変異蛋白をつくり、T $\beta\gamma$ 結合ドメインを検索した。またT $\beta\gamma$ の視細胞外節膜への再結合の過程への、MEKAならびにその結合ドメイン欠損MEKAの影響について検討した。

【方法ならびに結果】

バキュロウイルスを用いた組換え蛋白質合成法により、野生型MEKA(WT)蛋白質ならびにその各種欠損変異型蛋白質を合成、陰イオン交換樹脂ならびに、ゲルロ過クロマトグラフィーにより精製した。

T $\beta\gamma$ とWTを混和したゲルロ過カラムにかけると、それぞれ単独で流出した位置よりも高分子側、すなわち74kDaの球状蛋白質が流出する位置にシフトし、T $\beta\gamma$ とMEKAが一対一に結合した三量体(78kDa)となることが示された。N末端16アミノ酸残基を欠損したMEKA($\Delta N16$)の流出位置も高分子側シフトし、三量体として流出した。N末端42アミノ酸残基を欠損($\Delta N42$)すると、結合能が失われ両蛋白質は異なるピークとして現れた。C末端側は106アミノ酸残基欠損($\Delta C140$)させても結合能を維持しており、三量体を形成した。63番目から153番目迄のアミノ酸を欠損したもの($\Delta 63-153$)については結合能を失っていることが分かった。以上の結果より、T $\beta\gamma$ との結合に必要なドメインは、Aキナーゼによるリン酸化部位の73-Serを中心とした、17番目アミノ酸から139番目アミノ酸にわたる部分に存在すると考えられた。とくに17残基から42残基の狭い範囲に必須のドメインがあると考えられた。

MEKAをAキナーゼでリン酸化すると、T $\beta\gamma$ との結合能を失った。リン酸化していないMEKAとT $\beta\gamma$ を一度結合させた後、その三量体をAキナーゼでリン酸化すると、再び解離した。T $\beta\gamma$ に結合した状態においても、MEKAのリン酸化部位は表面に露出しており、リン酸化され得るのだと考えられる。結合ドメインの中ほどにリン酸化部位があり、結合ドメインと重複している可能性も考えられたが、本結果からはAキナーゼによるリン酸化部位はT $\beta\gamma$ との結合ドメインとは異なることが示唆された。

次に、MEKAがトランスデューションの活性化サイクルを修飾する機能を担っている可能性を検討した。一度活性化して視細胞ディスク膜から遊離したT $\beta\gamma$ は、再度ディスク膜に結合して、GDP結合型トランスデューション α サブ

ユニット (T α - GDP) のディスク膜への再結合と GDP-GTP 交換反応を促進する。このリサイクルの過程の一部として、ウシ網膜視細胞外節ディスク膜と T $\beta\gamma$ の結合反応に対する MEKA の作用を検討した。両者をインキュベート後遠心し、ディスク膜に結合せず上清に残った T $\beta\gamma$ の量と、ディスク膜と結合した T $\beta\gamma$ の量をウェスタンプローティングで測定したところ、ほぼ全量がディスク膜に結合し、上清には検出されなかった。WT-MEKA を T $\beta\gamma$ とインキュベートしたのちディスク膜との結合をみると、T $\beta\gamma$ のディスク膜への結合は完全に阻害された。N 末端を42 残基欠失し T $\beta\gamma$ 結合能を失った $\Delta N42$ を用いると、この阻害効果はみられなかった。T $\beta\gamma$ 結合能を保持する $\Delta N16$ では WT と同様の効果を示した。以上の結果より、MEKA はディスク膜から遊離した T $\beta\gamma$ のディスク膜へのリサイクルの過程を抑制し、その機能には T $\beta\gamma$ との結合ドメインが必要であると考えられた。

【総括】

MEKA が T $\beta\gamma$ と結合するのに必要なドメインは、N 末端より17残基から139残基にわたる部分に存在し、とくに 17 残基から42 残基の狭い範囲に必須のドメインがあると考えられた。MEKA は、光活性化のリサイクルの過程で、T $\beta\gamma$ が視細胞ディスク膜に結合するのを抑制する機能を有することが示唆され、この機能の遂行には、T $\beta\gamma$ との結合ドメインが関与していることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

網膜特異蛋白質である MEKA は、トランスデューション $\beta\gamma$ と結合し、その GTPase 活性を抑制する蛋白質である。MEKA は視覚における重要な蛋白質であるが、その生理的機能については未だ不明な部分が多い。本研究では遺伝子組換えによって MEKA の欠損変異蛋白を作製し、MEKA が N 末端17から42アミノ酸残基の部分でトランスデューション $\beta\gamma$ と結合することを明らかにした。さらに、トランスデューション $\beta\gamma$ の視細胞ディスク膜への再結合を抑制することを明らかにするとともに、N 末端42アミノ酸を欠損し、トランスデューション $\beta\gamma$ との結合能を欠く変異蛋白ではこの抑制作用は認められないことを明らかにした。これによって、MEKA は N 末端17から42アミノ酸残基の部分でトランスデューション $\beta\gamma$ と結合し、この結合ドメインを介してトランスデューション $\beta\gamma$ のディスク膜への再結合を抑制していることが明らかになった。本研究では G 蛋白質を介した情報伝達機構を解明するとともに視覚のメカニズムを生理的に解明したものであり、学位を授与するに値するものと認める。