

Title	網膜 MEKA (Phosducin) 蛋白質のトランスデュースン 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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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 の欠損変異蛋白質をつくり、 $T\beta\gamma$ 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、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。

$T\beta\gamma$ と WT を混和したゲルろ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 74 KDa 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ン α サブ

ユニット ($T\alpha$ -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 $T\beta\gamma$ の量をウェスタンブロット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、トランスデュシン $\beta\gamma$ 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 の欠損変異蛋白質を作製し、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シン $\beta\gamma$ と結合していることを明らかにした。さらに、トランスデュシン $\beta\gamma$ 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、トランスデュシン $\beta\gamma$ との結合能を欠く変異蛋白質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シン $\beta\gamma$ と結合し、この結合ドメインを介してトランスデュシン $\beta\gamma$ 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。