



Title	Transducin activates cGMP phosphodiesterase by trapping inhibitory subunit freed spontaneously from the catalytic subunits in solution
Author(s)	浅野, 禎三
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/72622">https://doi.org/10.18910/72622</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 浅 野 禎 三 )	
論文題名	<p>Transducin activates cGMP phosphodiesterase by trapping inhibitory subunit freed spontaneously from the catalytic subunits in solution.</p> <p>(トランスデュシンは水溶液中で触媒サブユニットから自発的に解離した抑制性サブユニットを捕捉することでcGMPホスホジエステラーゼを活性化する)</p>
論文内容の要旨	
<p>脊椎動物の視細胞では、酵素カスケードは光応答発生メカニズムにおいて重要な役割を果たしている。光を受容し活性化された視物質は、三量体Gタンパク質の一種であるトランスデュシンの<math>\alpha</math>サブユニット (<math>T\alpha</math>) に結合しているGDPのGTPへの置換を触媒することにより<math>T\alpha</math>を活性化する (<math>T\alpha^*</math>)。 <math>T\alpha^*</math>はさらにcGMPホスホジエステラーゼ (PDE) を活性化する。PDEは2種類の触媒サブユニット (<math>PDE\alpha</math>、<math>PDE\beta</math>) および2つの抑制性サブユニット (<math>PDE\gamma</math>) からなる四量体タンパク質である。<math>PDE\alpha</math>と<math>PDE\beta</math>はアミノ酸配列の70%以上が一致している相同性の高いサブユニットであり、それぞれがcGMPをGMPへと加水分解する活性部位を持っている。<math>PDE\gamma</math>はそれぞれの触媒サブユニットに結合することでcGMP分解活性を抑制している。<math>T\alpha^*</math>は<math>PDE\gamma</math>と結合することで触媒サブユニットの活性部位にかかっていた抑制を解除することでPDE活性化する。PDEの活性化によって細胞内のcGMP濃度の低下が起こり視細胞膜上にあるcGMP依存性陽イオンチャネルが閉じることで、過分極性の光応答が生じる。</p> <p><math>T\alpha^*</math>によるPDEの活性化反応は、触媒サブユニットに結合した状態の<math>PDE\gamma</math>に<math>T\alpha^*</math>が結合し、<math>PDE\gamma</math>を触媒サブユニットの活性化部位から解離させることにより起こると信じられている。しかしながら近年の<math>PDE\gamma</math>-<math>PDE\alpha</math>複合体および<math>PDE\gamma</math>-<math>T\alpha^*</math>複合体の構造解析研究により、<math>PDE\gamma</math>はC末端領域にあるアミノ酸 (Asp-63からIle-87) で<math>T\alpha^*</math>と結合しており、また<math>PDE\alpha</math>とも同様にC末端領域にあるアミノ酸 (Leu-60からIle-87) で結合していることが報告された。<math>PDE\gamma</math>はほぼ同じ領域のアミノ酸によって<math>PDE\alpha</math>または<math>T\alpha^*</math>と結合しているという事実は、<math>PDE\gamma</math>は<math>PDE\alpha</math>および<math>T\alpha^*</math>とは同時には結合することはできないことを意味しており、従来信じられている活性化メカニズムでは<math>T\alpha^*</math>によるPDEの活性化を十分に説明できないことを示唆している。そこで私は<math>T\alpha^*</math>によるPDEの活性化メカニズムを明らかにしたいと考えた。</p> <p>まず<math>PDE\gamma</math>と各タンパク質との相互作用解析を行った。高純度に精製したタンパク質を用いて<math>T\alpha^*</math>と<math>PDE\gamma</math>または四量体PDEとの相互作用を表面プラズモン共鳴法により測定した結果、<math>PDE\gamma</math>は四量体PDEと比べてより高いアフィニティで<math>T\alpha^*</math>と結合することが明らかになった。この結果は、<math>T\alpha^*</math>は触媒サブユニットと結合した状態の<math>PDE\gamma</math>とは複合体を形成しにくい可能性を示している。つまり<math>T\alpha^*</math>によるPDEの活性化は、従来考えられているような触媒サブユニットに結合した状態の<math>PDE\gamma</math>に<math>T\alpha^*</math>が結合することで<math>PDE\gamma</math>を触媒サブユニットの活性化部位から解離させるというメカニズムではなく、触媒サブユニットから解離した<math>PDE\gamma</math>を<math>T\alpha^*</math>が結合し<math>PDE\gamma</math>の触媒サブユニットへの再結合を阻害することで、PDEの活性化状態を維持している可能性が考えられた (トラッピングメカニズム)。そこでこのメカニズムによる活性化の反応式を解き、得られた理論式と実験結果が一致するかどうかを調べることにした。そのために<math>PDE\gamma</math>-<math>PDE\alpha</math>複合体および<math>PDE\gamma</math>-<math>T\alpha^*</math>複合体の<math>K_D</math>を実験的に求めた。</p> <p>まず<math>PDE\gamma</math>と触媒サブユニットとの解離定数 (<math>K_D</math>) をpH assay法を用いて水溶系、膜系でそれぞれ測定した。その結果水溶系における<math>K_D</math>は10pM、一方で膜系における<math>K_D</math>は54pMであった。さらに<math>PDE\gamma</math>と<math>T\alpha^*</math>との<math>K_D</math>を表面プラズモン共鳴法を用いて測定したところ、0.73~5.6nMという結果が得られた。これらの<math>K_D</math>を理論式に代入し<math>T\alpha^*</math>によるPDEの活性化効率を理論的に求め、実験的に求めた値と比較した。その結果、水溶系においてはトラッピングメカニズムは従来のメカニズムよりも、より適切に実験結果を説明することができた。一方で膜系においては、10<math>\mu</math>Mの視物質を含む膜濃度では適切に説明できるが、1.5<math>\mu</math>M、20<math>\mu</math>Mの視物質を含む膜濃度においては説明できなかった。これはタンパク質の</p>	

構造が膜環境に影響されるためだと考えられる。

以上の結果から、 $T\alpha^*$ によるPDEの活性化は少なくとも水溶系において、トラッピングメカニズムに従って起こっていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 浅 野 禎 三 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	上田 昌宏
	副 査	教 授	平岡 泰
	副 査	教 授	山本 亘彦
	副 査	准 教 授	西條 將文

## 論文審査の結果の要旨

視細胞が光に応答する際には、活性型となった三量体Gタンパク質（トランスデューシン、以下Trと略記）が効果器タンパク質であるcGMPホスホジエステラーゼ（PDE）を活性化する反応が必須である。

浅野氏は、従来考えられている酵素反応様式ではこの活性化反応を定量的に説明できないことを見出した。そこで、TrとPDEの相互作用を表面プラズモン共鳴法および生化学的活性測定法により詳細に検討し、その結果、新たな酵素反応スキームを提案するに至った。新たなスキームでは、従来考えられているようにTrが直接的にPDEに結合して活性化するのではなく、むしろ、PDEから自発的に解離したPDE阻害サブユニットが再びPDE触媒サブユニットに再結合するのをTrが阻害することにより間接的にPDEの活性化状態を維持する。

この説は、20年来支持されている従來說とは全く異なる説である。視細胞の応答形成を定量的に理解する上で本研究の結果は重要であり、独創性の高いものであると判断できる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。