

## ウシ網膜桿体外節における GTP 結合蛋白質(トランスデューション) の活性調節機序

大 黒 浩

札幌医科大学眼科学講座 (主任 中川喬教授)

深 田 吉 孝\*

札幌医科大学学生化学第1講座 (主任 秋野豊明教授)

### Regulatory Mechanism of Activity of GTP-Binding Protein (Transducin) in Rod Outer Segments of Bovine Retina

Hiroshi OHGURO

Department of Ophthalmology, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. T. Nakagawa)

Yoshitaka FUKADA\*

Department of Biochemistry (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. T. Akino)

Transducin, a GTP-binding protein found in the bovine rod outer segment, mediates the signal coupling between rhodopsin and cGMP phosphodiesterase. Recent observations have revealed that transducin consists of two functional subunits:  $T\alpha$  (Mr 39,000) and  $T\beta\gamma$  (Mr 35,000 and 8,000), and that photolyzed rhodopsin catalyzes the exchange of GTP for GDP bound to  $T\alpha$  and, in this case,  $T\beta\gamma$  regulates the binding of GTP to  $T\alpha$ . This process, i. e., transducin activation, is an important amplified step to signal the start of transduction during photon absorption by rhodopsin. Therefore, we intended to elucidate the regulatory mechanism of the transducin activation in retina.

We found subspecies of  $T\beta\gamma$  during the purification of  $T\beta\gamma$  from the bovine retinal rod outer segment. Purified  $T\beta\gamma$  was separated into three components by chromatography on Mono-Q, an anion exchange column, equipped with FPLC. One of the components caused substantially no enhancement of GppNHp, a nonhydrolyzable analogue of GTP, binding activity to  $T\alpha$  in the presence of photolyzed rhodopsin. These findings indicate that there are functionally two different forms in  $T\beta\gamma$ , i. e., active and inactive forms. Each  $T\beta\gamma$  subspecies showed the same mobility as  $T\beta$  and  $T\gamma$  in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The mobility of  $T\gamma$  was distinctly different, however, between the active and inactive forms in 8M urea-PAGE and 8M urea-SDS-PAGE. Therefore, it is likely that the functional heterogeneity of  $T\beta\gamma$  depends on the structural heterogeneity of  $T\gamma$ . Purified  $T\gamma$  was further separated into four subspecies ( $T\gamma$ -1,  $T\gamma$ -2,  $T\gamma$ -3, and  $T\gamma$ -4) by high-performance liquid chromatography on a C18 reverse phase column.

\* 現所属：京都大学理学部生物物理学教室 (主任 吉澤透教授)

#### Abbreviations

MOPS : 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid

CHAPS : 3-[3-Cholamidopropyl]-dimethylammonio]-1-propane sulfonate

DTT : Dithiothreitol

PMSF : Phenylmethane sulfonyl fluoride

BIS : N, N'-Methylene-bis-acrylamide

TEMED : N, N, N', N'-Tetramethyl ethylenediamine

Con A : Concanavalin A

However, the amino acid sequences of these four  $T\gamma$  seemed to be identical to each other. These  $T\gamma$  subspecies consisted of 68 amino acid residues, in which N-terminal amino acid was Pro and C-terminal amino acid was Gly. These results indicate that the structural heterogeneity of  $T\gamma$ , which was shown by 8M urea electrophoresis, depends on its structural modification which introduces different surface charges on the molecule.

(Received December 19, 1987 and accepted January 25, 1988)

**Key words:** Transducin, GTP-binding protein, Photochemical cycle, Rhodopsin, Retina

## 1 緒 言

脊椎動物の視細胞桿体外節においては数個のロドプシン（光受容蛋白質）の光退色が、細胞内の何らかの增幅、伝達過程を経て桿体外節形質膜上の数100個のカチオンチャネルを閉鎖して受容器電位を発生する（視興奮）。この視興奮過程の分子機構については、現在次のような仮説が提唱されている。極く微量のロドプシンの光退色に伴い、桿体外節に存在するGTP結合蛋白質（トランスデューション）が活性化され、これがさらにcGMP分解酵素であるcGMPホスホジエステラーゼを活性化する。その結果細胞内cGMP濃度は急減し、カチオンチャネルが閉鎖する。これが視興奮過程のcGMP説<sup>1,2)</sup>である。本研究は、このカスケードの中でも特に、ロドプシンと直接共役して活性化されるトランスデューションに焦点をしづり、トランスデューションがその機能を発現する際の活性調節機構を解明することを目的とした。

脊椎動物の視細胞桿体外節のトランスデューションは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$  ( $T\alpha$ ,  $T\beta$ ,  $T\gamma$ ) の3つのサブユニットより構成されており、生理的条件では  $T\beta$  と  $T\gamma$  は解離せず、 $T\alpha$  及び  $T\beta\gamma$  の形で存在している<sup>3)</sup>。GTP結合能は  $T\alpha$  のみが有しており、この結合能を  $T\beta\gamma$  が制御している<sup>4)</sup>と考えられている。視興奮発現の初期過程においては、まず視細胞桿体外節の円板膜に存在するロドプシンが光量子を吸収し、メタロドプシンIIという退色中間体が生成する。暗所では、 $T\alpha$  にはGDPが結合しているが、メタロドプシンIIが生成すると、GDP-トランスデューションはこの中間体に結合する。この瞬間に  $T\alpha$  に結合していたGDPは、細胞質中に存在しているGTPと置き換わり(GDP/GTPの交換反応)、活性型であるGTP-トランスデューションが生成する。 $T\alpha$  のGTPの結合により活性化されたトランスデューションは、メタロドプシンIIから遊離して  $T\alpha$ -GTP と  $T\beta\gamma$  に解離するが、この  $T\alpha$ -GTP は、cGMPホスホジエステラーゼを活性化し、cGMPカスケード反応が進行する<sup>5,6)</sup>。

著者ら<sup>7)</sup>はウシ網膜からトランスデューションを精製する過程において、 $T\beta\gamma$  には  $T\alpha$  と共に存在する分子種と  $T\alpha$  とは共役しない分子種が存在することを見出した。本研究では、予備的に得られたこの知見を詳細に検討した。すなわち、前報<sup>7)</sup>とは異なった方法で、ウシ網膜からトランスデューションを精製し、in vitro でロドプシンとトランスデューションの再構成実験を行なった。 $T\alpha$  のGTP結合能発現には、メタロドプシンII及び  $T\beta\gamma$  の存在が必須であるが、その用量依存性を精査した結果、 $T\alpha$  のGTP結合能発現に対する効果の異なる複数の  $T\beta\gamma$  分子種が存在することを確認した。さらにこの分子種の機能上の違いは、 $T\gamma$  の違いに起因することを明らかとし、トランスデューション活性発現の調節機構に関する新たな知見が得られたので報告する。

## 2 実験材料及び方法

### 2・1 実験材料

ウシ眼球は、京都中央畜産副生物卸協同組合より購入した。 $[^3H]$  GppNHp (guanosine 5'-( $\beta$ ,  $\gamma$ -imido [ $8-^3H$ ] triphosphate) は、アマシャム社製を使用した。その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

### 2・2 視細胞桿体外節 (rod outer segment, ROS) の分離

視細胞桿体外節の分離は、Fung and Stryerの方法<sup>4)</sup>に準じて行なった。特に断わらない限り、全ての操作は4°Cで行なった。まず屠殺場で得られた新鮮なウシ眼球を2時間暗順応した後、暗赤色光下（赤色ガラスフィルターVR68を使用、東芝硝子社製）にて網膜を剥離した。剥離網膜を緩衝液A (60 mM KCl, 30 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10 mM MOSP, pH 7.5) に懸濁し、30,000×g, 15分間遠心後、沈殿した網膜を遮光して冷凍（-80°C）保存した。次に、暗赤色光下で解凍した100-200枚の網膜に44% (W/V) ショ糖を含む緩衝液A (200 mL) を加え、1分間激しく振とうした後、30,000×g, 20分間遠心して上清(上清1-1)を回収した。沈渣には再び44% ショ糖を含む緩衝液A (200 mL) を加え、同様の操作

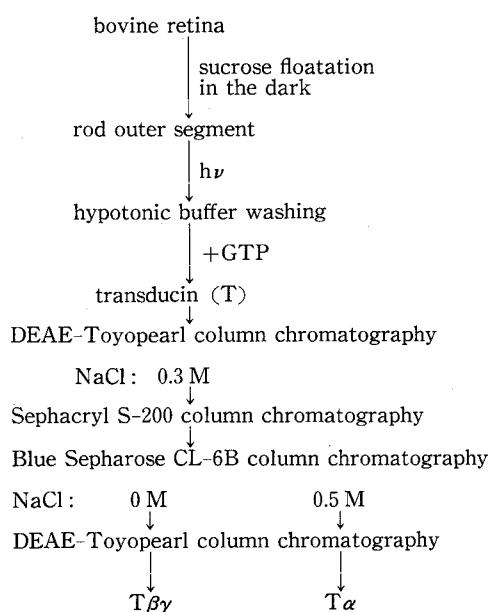


Fig. 1 Purification procedures of  $T\alpha$  and  $T\beta\gamma$  from bovine retina in the present study.

(振とう及び遠心)により上清を回収した(上清1-2)。以上の操作で桿体外節は上清1-1と上清1-2に回収される。上清1-1と1-2(合計約400 ml)をガーゼで濾過した後、等容量の緩衝液Aを加えてショ糖濃度を約20%(W/V)に希釈し、30,000×g、20分間遠心した。この上清を捨て、桿体外節を含む沈渣を36%(W/V)ショ糖を含む緩衝液A(200 ml)に懸濁し、1分間激しく振とうした後、30,000×g、20分間遠心し上清(上清2-1)を回収した。沈渣には再び36%ショ糖を含む緩衝液A(200 ml)を加え、同様の操作(振とう及び遠心)により上清を回収した(上清2-2)。桿体外節を含む上清2-1と2-2(合計約400 ml)に200 mlの緩衝液Aを加えてショ糖濃度を約24%(W/V)に希釈し、30,000×g、20分間遠心した。上清を捨て桿体外節を含む沈渣を緩衝液Aで懸濁しポッターポリエチレンジサイドにて10回ホモゲナイズした後、30,000×g、20分間遠心した。以上の操作は全て暗赤色光下で行ない、これ以降の操作は、明所(通常の実験室の光条件下)で行なった。上清を捨て、遠心で得られた沈渣を0.3 mM EDTAを含む緩衝液B(0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 5 mM Tris-HCl, pH 7.2)に懸濁後、ポッターポリエチレンジサイドにて10回ホモゲナイズした後、100,000×g、20分間遠心した。上清を捨て沈渣を遮光して冷凍保存(-80°C)した。

### 2・3・1 トランスデューションの抽出と $\alpha$ 及び $\beta\gamma$ サブユニットの分離と精製

-80°Cで遮光保存した視細胞桿体外節の沈渣を解凍後に緩衝液Bで懸濁、ポッターポリエチレンジサイドにて10回ホモゲナイズした後、100,000×g、20分間遠心した。この操作を合計5回反復し、桿体外節に含まれる水溶性の蛋白質を除去した。トランスデューションも水溶性蛋白質であるが明条件下ではメタロドブシンIIが生成しているために、トランスデューションはメタロドブシンIIに結合したままで沈渣に回収される。次に沈渣を緩衝液Bで懸濁し、ポッターポリエチレンジサイドにて4回ホモゲナイズ後、終濃度が100 μMになるようにGTPを加えて、100,000×g、20分間遠心した。この操作によりトランスデューションはGTP結合型となり、メタロドブシンIIとの親和性を失って、上清に回収される。この抽出操作を合計5回反復して、トランスデューションを含む画分を膜画分より分離した。得られたトランスデューションを予め緩衝液Bで平衡化したDEAE-Toyopearl 650 S(東洋ソーダ社製)カラム(1×3 cm)に添加した(流速40 ml/hr)。緩衝液C(5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 20 mM Tris-HCl, pH 7.7)でカラムを洗浄後、吸着成分を0.3 M NaClを含む緩衝液Cで溶出した。次に、この溶出成分(約20 ml)を緩衝液D(5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM Tris-HCl, pH 7.7)で平衡化したSephadryl S-200(ファルマシア社製)カラム(2.5×120 cm)に添加し、緩衝液Dで蛋白質を溶出した(流速20 ml/hr)。分子量40,000付近の画分を回収し、緩衝液Cで10倍に希釈した後、この画分を緩衝液Cで平衡化したBlue Sepharose CL-6B(ファルマシア社製)カラム(2×10 cm)に添加した(流速20 ml/hr)。Blue Sepharose CL-6Bカラムの非吸着成分として $T\beta\gamma$ 画分を得、一方カラム吸着蛋白質を、0.5 M NaClを含む緩衝液Cで溶出し、 $T\alpha$ 画分を得た。 $T\beta\gamma$ 画分は、緩衝液Cで平衡化したDEAE-Toyopearl 650 Sカラム(1.5×30 cm)に吸着させ、一方 $T\alpha$ 画分は、緩衝液Cで20倍に希釈した後DEAE-Toyopearl 650 Sカラム(1.5×10 cm)に吸着させた。それぞれのカラムをカラム容量の約5倍量の緩衝液Cで洗浄後、0から0.5 M NaClの濃度勾配(計200 ml)で、蛋白質を溶出した。

### 2・3・2 Mono-Q カラムによる $T\beta\gamma$ 分子種の分離

Mono-Q(ファルマシア社製)カラム(5×50 mm)は、FPLCシステム(ファルマシア社製)に装着して用いた(流速1 ml/min)。まずカラムを予め緩衝液E(5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl, pH 7.7)で平衡化

した後、前述(2・3・1)の如く精製した  $T\beta\gamma$  画分(0.5 ml)を吸着させた。その後、緩衝液E(4 ml)でカラムを洗浄し、0 Mから1 MのNaCl直線濃度勾配をもつ緩衝液E(20 ml)により、 $T\beta\gamma$  の分子種の分離を行なった。

#### 2・4 ロドプシンの精製及び再構成

ロドプシンは、Fukada *et al.*の方法<sup>8)</sup>に従って分離、精製した。トランスデューション抽出後の膜画分を0.1 M NH<sub>2</sub>OHを含む緩衝液C(90 ml)に懸濁し、オレンジ色光(>500 nm、東芝ガラスフィルターVO52)を装着した650 W タングステンランプ使用)で30分照射した。NH<sub>2</sub>OHを除去するために、0.2 M NaClを含む緩衝液Cで、計5回膜画分を遠心(30,000×g、30分)洗浄した後、2%CHAPSを含む緩衝液Cでオプシンを可溶化した。可溶画分(105,000×g、1 hrの遠心上清)に含まれるオプシンに対して、モル比で1.5倍量の11-cisレチナール(HPLCで精製)を加え、37°Cにて16時間暗保してロドプシンを再生した。再生ロドプシンはCon A-Sepharose 4Bカラム(ファルマシア社製)で脱脂及び精製し<sup>8)</sup>、ロドプシンに対して138倍量(モル比)の卵黄ホスファチジルコリン(QP社製)を用いて透析法により再構成した。

#### 2・5 GppNHP binding assay

Fungの方法<sup>9)</sup>に従い、光照射(>500 nm、VO52フィルターを装着した650 W タングステンランプで1分間照射)した再構成ロドプシン(退色中間体:メタロドプシンII)及び $T\beta\gamma$ 共存下における $T\alpha$ の[<sup>3</sup>H]GppNHP(非水解性GTPアナログ)結合量を測定した。反応混液(150  $\mu$ l)には、終濃度で1.5  $\mu$ Mの再構成ロドプシン、10  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]GppNHP(600 dpm/p mol)、及び種々の濃度(各実験で異なる)の $T\alpha$ と $T\beta\gamma$ を加え、4°Cにて30分間反応を行なった。反応終了後、ニトロセルロースフィルター(0.45  $\mu$ m pore、東洋漉紙社製)を用いて反応混液を濾過し、洗浄緩衝液(1 mM MgCl<sub>2</sub>、100 mM Tris-HCl、pH 7.5)で数回フィルターを洗浄した。フィルターは乾燥した後、1 mlのメチルセロソルブで溶解し、8 mlのACS II(アマシャム社製)を加え [<sup>3</sup>H]放射活性を液体シンチレーションカウンター(Beckman LS9000)により測定した。

#### 2・6 電気泳動法

##### 2・6・1 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Laemmliの方法<sup>10)</sup>に準じて、蛋白質試料(50  $\mu$ l)に10% SDSを10  $\mu$ l、0.05%プロムフェノールブルー(以下BPBと略す)を含む75%グリセロールを7  $\mu$ l及び

$\beta$ -メルカプトエタノールを3  $\mu$ l加え、90°Cで5分間加熱したものを試料とした。13%の分離ゲル(厚さ1 mm)を用い、20 mA(定電流)で4時間電気泳動を行なった。分子量マーカーには、低分子用マーカーキット(ファルマシア社製)を使用した。泳動終了後、ゲルプレートは、0.1%クマシープル-R250及び50%メタノールを含む10%酢酸混液中で、室温で2時間固定染色後、5%メタノール及び10%酢酸混液中で10~12時間脱色した。

##### 2・6・2 8M 尿素-PAGE

Perrin and Perryの方法<sup>11)</sup>に従って行なった。ゲル重合液は、それぞれ終濃度で8%アクリルアミド、0.2%BIS、8M尿素となるように調製し、過硫酸アンモニウムとTEMEDによる重合を行なった(ゲルスラズの厚さは1 mm)。試料には終濃度でそれぞれ8M及び0.05%になるように尿素及びBPBを加えた。20 mM Tris-glycine(pH 8.9)溶液を泳動緩衝液に用い、350 V(定電圧)で2時間電気泳動を行なった。ゲルの固定染及び脱色は、2・6・1と同様の方法で行なった。

##### 2・6・3 8M 尿素-SDS-PAGE

Swank and Munkresの方法<sup>12)</sup>に従って行なった。蛋白質試料を凍結乾燥後、1% SDS、0.05% BPB、1% $\beta$ -メルカプトエタノール及び8M尿素を含む0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(pH 6.8)溶液(50  $\mu$ l)に溶解し、60°Cで10分間加熱して泳動用試料とした。終濃度で分離ゲルは、12.5%アクリルアミド、1.25%BIS、0.1% SDS、8M尿素及び0.01% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(pH 6.8)、濃縮ゲルは、4.7%アクリルアミド、0.47%BIS、0.05% SDS、8M尿素及び0.005% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(pH 6.8)となるようにそれぞれ調製し、過硫酸アンモニウムとTEMEDによる重合を行なった(ゲルスラズの厚さは2 mm)。0.1% SDSを含む0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(pH 6.8)溶液を泳動緩衝液に用い、40 V(定電圧)で9時間電気泳動を行なった。分子量マーカーには、ペプチド用マーカーキット(ファルマシア社製)を使用した。ゲルの固定染色及び脱色は、2・6・1と同様に行なった。

#### 2・7 $T\gamma$ 分子種の分離精製及びそのアミノ酸配列の解析

##### 2・7・1 $T\gamma$ 分子種の分離

2・3・1及び2・3・2で記した方法により精製した $T\beta\gamma$ 画分を、50 mM炭酸アンモニウムに対して透析した後に凍結乾燥した。このように凍結乾燥した $T\beta\gamma$ (約50 nmol)を6M塩酸グアニジンを含む50 mM Tris-HCl(pH 7.5)溶液1 mlに溶解し、予め同緩衝液で平衡化したSephadryl S-200カラム(1×50 cm)に添加し、同緩衝液により蛋白質を溶出した(流速10 ml/hr)。

## 2・7・2 逆相カラムを装着した High-performance liquid chromatography (HPLC) による $T\gamma$ 分子種の精製

装置は 655A-11 liquid chromatography pump, L-5000 LC controller, 655A variable wave length monitor (日立社製) を使用した。カラムは、C18 逆相カラム TSK-gel ODS 120T (4.6 × 250 mm, 東洋ソーダ社製)を使用した。0.1%トリフルオロ酢酸を含む 5% から 95% のアセトニトリル直線濃度勾配により蛋白質を溶出 (流速 1 ml/min) し, 215 nm における吸光度で溶出蛋白質の検出を行なった。

## 2・7・3 $T\gamma$ 分子種のアミノ酸分析

2・7・2 に記したように、逆相カラム (HPLC) で精製した  $T\gamma$  分子種 ( $T\gamma$ -1,  $T\gamma$ -2,  $T\gamma$ -3 及び  $T\gamma$ -4 をそれぞれ 1 n mol) を凍結乾燥後, 6M 塩酸に溶解, 脱気後, 減圧下に封管し, 110°C で 24 時間加水分解を行なった。加水分解された試料 (アミノ酸) を自動アミノ酸分析装置 (model KLA-3B, Hitachi custom Ion-Exchange Resin 2618, 日立社製) を用いて分析した。

## 2・7・4 $T\gamma$ 分子種のアミノ酸一次配列の分析

2・7・2 に記したように、逆相カラム (HPLC) で精製した  $T\gamma$  分子種 ( $T\gamma$ -1,  $T\gamma$ -2,  $T\gamma$ -3 及び  $T\gamma$ -4 をそれぞれ 1 n mol) を凍結乾燥後, 0.1% トリフルオロ酢酸を含む 40% アセトニトリル溶液に溶解し, 470 A 気相アミノ酸シーケンサー (アプライドバイオシステム社製) にて自動エドマン分解を行なった。切断されたアミノ酸のフェニルチオヒダントイン (PTH) 誘導体を PTH アナライザー 120 A (アプライドバイオシステム社製) にて同定し, 蛋白質及びペプチドのアミノ末端側からのアミノ酸配列を解析した<sup>13)</sup>。

## 2・7・5 $T\gamma$ 分子種のカルボキシル末端アミノ酸の解析

2・7・2 に記したように、逆相カラム (HPLC) で精製した  $T\gamma$  分子種 ( $T\gamma$ -1,  $T\gamma$ -2,  $T\gamma$ -3 及び  $T\gamma$ -4 をそれぞれ 1.5 n mol) を凍結乾燥後, 0.05% TritonX-100 を含む 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.6) 50  $\mu$ l に溶解し, 基質蛋白質 1.5 n mol に対して 18.9 p unit になるように carboxypeptidase-P (宝酒造社製) を加え, 室温にて 3 分, 5 分, 30 分及び 180 分間反応させた。0.02 M HCl を 300  $\mu$ l 加えて反応を停止し, 500 × g, 5 分間遠心して沈殿物を除去した後, 上清に含まれる遊離アミノ酸を自動アミノ酸分析装置 (2・7・3 参照) を用いて同定した<sup>14,15)</sup>。

## 2・7・6 プロモシアーン分解による $T\gamma$ 分子種の解析

2・7・2 で記したように、逆相カラム (HPLC) で精製

した  $T\gamma$  分子種 ( $T\gamma$ -1,  $T\gamma$ -2,  $T\gamma$ -3 及び  $T\gamma$ -4 をそれぞれ 5 n mol) を凍結乾燥した後, 50 mM DTT, 3 mM EDTA 及び 6M 塩酸グアニジンを含む 0.5 M Tris-HCl (pH 8.4) 溶液 1 ml に溶解し, 暗所にて 37°C で 24 時間還元した。還元終了後, 18 mg のヨードアセタミドを加え, 暗所にて 37°C で 1 時間反応を行なった。未反応のヨードアセタミドを除去するために, 0.2 M DTT を含む 2 mM EDTA 溶液 100  $\mu$ l を各試料に加えた後, 脱イオン水に対して透析した。アセトアミド化された蛋白質を凍結乾燥後, 20 mM プロモシアーンを含む 70% 醋酸 0.5 ml に溶解し, 暗所にて 37°C で 24 時間分解を行なった。このようにして得られたペプチド断片を再び凍結乾燥し, 逆相カラム (HPLC) により断片を分離 (2・7・2 参照) した後, ペプチド断片の N 末端側からのアミノ酸配列の決定 (2・7・4 参照) を行なった。

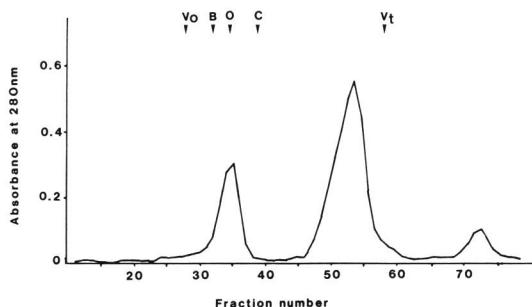
## 2・8 その他の分析法

タンパク質の定量は, 牛血清アルブミンを標準物質とし, Bradford の方法<sup>16)</sup>あるいは Bensadoun and Weinstein の方法<sup>17)</sup>により行なった。

## 3 成 績

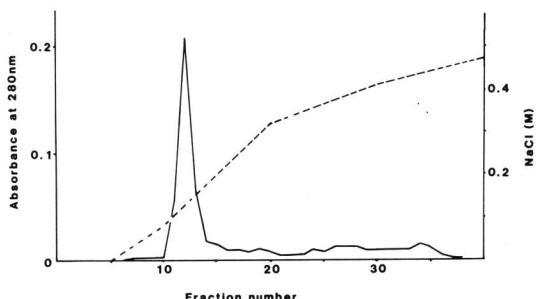
### 3・1 ウシ視細胞桿体外節の分離及びトランスデューションの $\alpha$ 及び $\beta\gamma$ サブユニットの分離と精製

2・2 の方法により分離されたウシ視細胞桿体外節画分は, ロドプシンに起因する鮮紅色を呈した。ついで 2・3・1 に記した方法により桿体外節からトランスデューションを精製した。視細胞桿体外節から低イオン強度緩衝液を用いて水溶性蛋白質を除去した後, 円板膜に存在するメタロドプシン II に結合したトランスデューションを GTP (100  $\mu$ M) 添加により特異的に膜から分離した。この方法により抽出されたトランスデューション画分を DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィーによって濃縮した後, Sephadryl S-200 カラムによりゲル濾過を行なった (Fig. 2)。カラム総体積の位置に溶出したピークは, その吸収スペクトルからグアニンヌクレオチドであることが判明し, 約 90% の蛋白質 (トランスデューション) は分子量 40,000 付近に单一ピークとして溶出した。トランスデューションの抽出に用いた GTP 及びその加水分解産物である GDP は,  $T\alpha$  の GTP 結合能測定の際に拮抗的に作用する妨害物質となるため, このゲル濾過操作は重要な精製操作であると思われた。次に, トランスデューションの  $\alpha$  ( $T\alpha$ ) 及び  $\beta\gamma$  ( $T\beta\gamma$ ) サブユニットの分離は, Blue Sepharose CL-6B カラムに対する親和性の差を利用して行なった。緩衝液 C を用いた場合,  $T\alpha$  は Blue Sepharose CL-6B カラムに



**Fig. 2** Gel filtration of extracted transducin on Sephadryl S-200 column. The transducin rich fraction extracted from bovine rod outer segments was applied on Sephadryl S-200 column ( $2.5 \times 120$  cm) and eluted with buffer D (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM Tris-HCl, pH 7.7) at flow rate of 20 ml/h. The molecular standard proteins used were B (bovine serum albumin, 67 kDa), O (ovalbumin, 43 kDa) and C (chymotrypsinogen A, 25 kDa). Vo and Vt indicate excluded and totally included column volumes, respectively. The first peak contains transducin.

結合するが、T $\beta\gamma$ は結合しないことをを利用して両者を分離した後、T $\alpha$ 及びT $\beta\gamma$ をそれぞれDEAE-Toyopearlカラムクロマトグラフィーによってさらに精製した。T $\alpha$ は、DEAE-ToyopearlよりNaCl濃度約0.13 Mの位置に溶出し(Fig. 3-A)，このピーク画分のSDS-PAGEによる分析では、分子量39,000の単一バンドを示した(Fig. 3-B)。T $\beta\gamma$ は、DEAE-

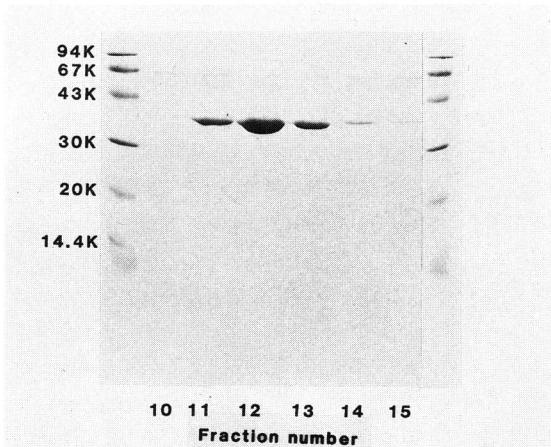


**Fig. 3**  
A : Purification of T $\alpha$  by an anion-exchange column chromatography on DEAE-Toyopearl. T $\alpha$  fraction separated by column chromatography on Blue Sepharose CL-6B was applied on DEAE-Toyopearl column ( $1.5 \times 10$  cm) and eluted with a gradient of 0-0.5 M NaCl in buffer C (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 20 mM Tris-HCl, pH 7.7) at flow rate of 15 ml/h. The gradient of NaCl is shown as dotted line. Absorbance at 280 nm is shown as solid line.

ToyopearlよりNaCl濃度約0.05 Mの位置に溶出した(Fig. 4-A)。このピーク画分のSDS-PAGEにより分析すると、分子量がそれぞれ35,000(T $\beta$ )と約8,000(T $\gamma$ )の二本のバンドのみが認められた(Fig. 4-B)。

### 3・2 複数のT $\beta\gamma$ 分子種

T $\alpha$ のGTP結合能に対するT $\beta\gamma$ の効果を検討するために、GTPの非水解性アナログであるGppNHpを基質に用い、T $\alpha$ のGTP結合活性の測定を行なった。実験には、T $\beta\gamma$ の最後の精製段階であるDEAE-Toyopearlカラムからの溶出画分(Fig. 4-A)を用い、各画分の一定容量にロドブシンとT $\alpha$ を一定量加えることによって、各画分のT $\beta\gamma$ としての活性(T $\alpha$ のGppNHp結合能を促進させる能力)を測定した(Fig. 5)。その結果、驚くべきことに、T $\beta\gamma$ はDEAE-Toyopearlカラムより見かけ上单一のピークとして溶出するにも拘らず、溶出ピークの前半と後半の画分では、T $\alpha$ のGTP結合能を促進する能力(T $\beta\gamma$ としての活性)が明らかに異なっていた(Fig. 5)。すなわち、T $\beta\gamma$ としての活性を蛋白質当たりの活性に規格化すると、その値は溶出ピーク前半よりも後半で著しく高いことが明らかになった。SDS-PAGEによる分析では、このピークのいずれの画分(フラクション20-27)にもT $\beta\gamma$ 以外の夾雜蛋白質の存在は認められない(Fig. 4-B)。従って以上の結果から、T $\alpha$ のGTP結合能を促進する効果の異なるT $\beta\gamma$ 分子種が複数存在することが示唆され



**Fig. 3**  
B : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the fractions obtained by DEAE-Toyopearl column chromatography(panel A). The gel was stained with Coomassie blue.

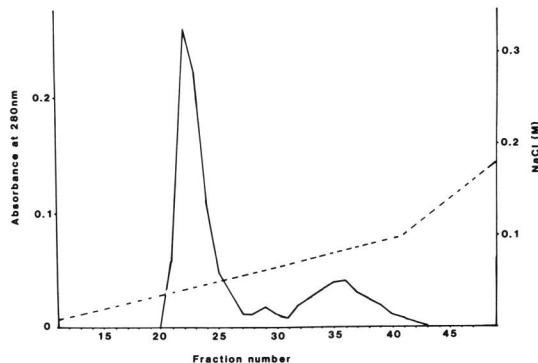


Fig. 4

A : Purification of  $T\beta\gamma$  by an anion-exchange column chromatography on DEAE-Toyopearl.  $T\beta\gamma$  fraction separated by column chromatography on Blue Sepharose CL-6B was applied on DEAE-Toyopearl column( $1.5 \times 30$  cm) and eluted with a gradient of 0-0.18 M NaCl in buffer C at a flow rate of 15 ml/h. The gradient of NaCl is shown as dotted line. Absorbance at 280 nm is shown as solid line.

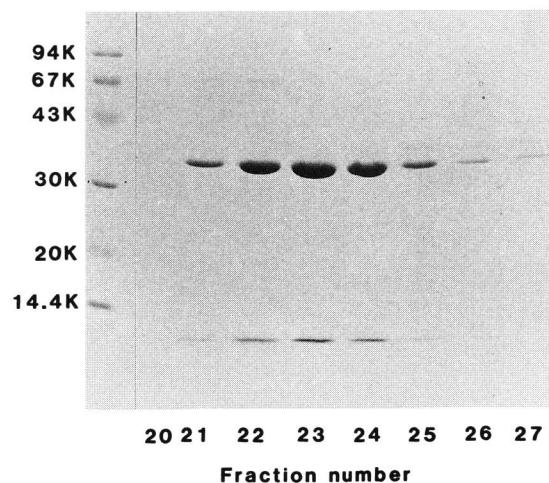


Fig. 4

B : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the fractions obtained by DEAE-Toyopearl column chromatography(panel A). The gel was stained with Coomassie blue.

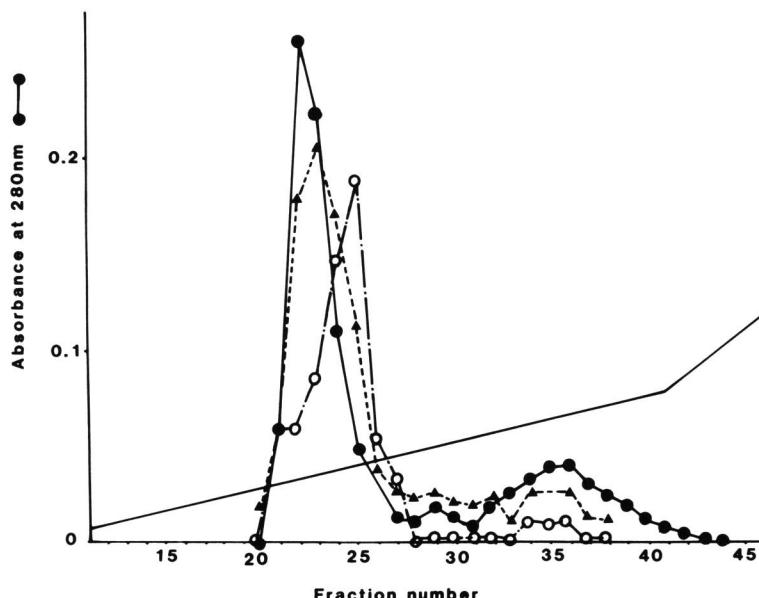
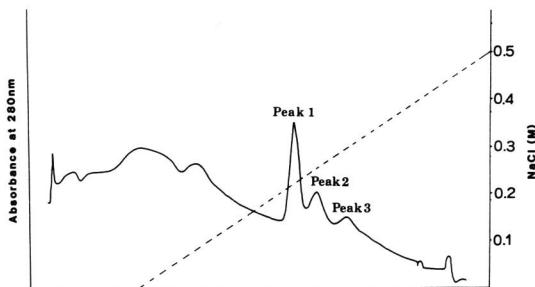


Fig. 5 Comparison of elution profiles of  $T\beta\gamma$  from the DEAE-Toyopearl column with their inducing abilities on GppNHp binding activity of  $T\alpha$ . In the presence of bleached rhodopsin, each fraction( $10 \mu l$ ) was mixed with the constant amount of  $T\alpha$ ( $75 \mu g/ml$ , purified as in Fig. 3, A) to measure the inducing abilities on GppNHp binding activity of  $T\alpha$ . The GppNHp binding activity ( $\Delta-\cdots-\Delta$ ) of each mixture was estimated by the procedures described in Material and Methods section. The values ( $\circ-\cdots-\circ$ ) were normalized with the absorbance at 280 nm ( $\bullet-\cdots-\bullet$ ) of each fraction.

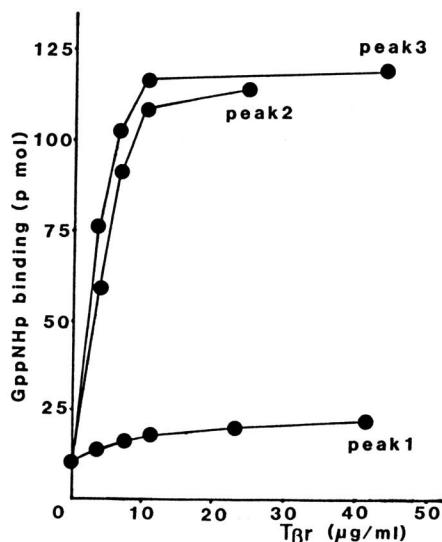
た。そこで次に、これら複数の  $T\beta\gamma$  分子種を完全に分離することを目的として、Mono-Q カラムを装着した FPLC による分析を行なった。Fig. 5 のフラクション 21 から 28 までの画分を併せた後、緩衝液 E にて 5 倍に希

釈した試料を Mono-Q カラムに添加し、NaCl の直線濃度勾配で溶出すると、 $T\beta\gamma$  は NaCl 濃度が 220 mM, 250 mM 及び 290 mM の位置に 3 つピークに分離して溶出した(Fig. 6-A)。これら 3 つのいずれのピークも、



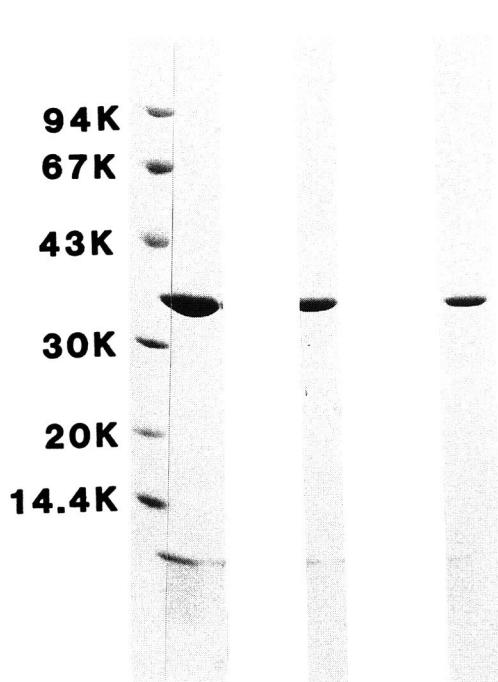
**Fig. 6**  
A : Mono-Q column chromatography of  $T\beta\gamma$  fractions recovered from the DEAE-Toyopearl column chromatography.

$T\beta\gamma$  fractions recovered from the DEAE-Toyopearl column chromatography (fraction 21-28 in Fig. 5, A) were combined and diluted 5-fold with buffer E, followed by application to the Mono-Q column (5×50 mm) equipped with FPLC. Proteins were eluted with a linear gradient of 0-1.0 M NaCl in buffer E at flow rate of 1 ml/min. Three subspecies of  $T\beta\gamma$  (peak 1, peak 2 and peak 3) were eluted from the column at apparently 220 mM, 250 mM and 290 mM NaCl, respectively.



**Fig. 7** GppNHp binding experiments with reconstituted rhodopsin, purified  $T\alpha$  (66  $\mu$ g/ml) and various fractions of  $T\beta\gamma$  isolated by Mono-Q column chromatography. GppNHp binding assay was done with various concentrations of  $T\beta\gamma$  (peak 1-3 in Fig. 6, A) by the method described in Materials and Methods section.

SDS-PAGEによる分析では、分子量がそれぞれ35,000の $T\beta$ と、約8,000の $T\gamma$ から構成されていた(Fig. 6-B)。この結果から、 $T\beta\gamma$ には、表面荷電の異なる3つの分子種が存在することが示唆された。次に、これらの3つのピーク(Mono-Qカラムから低イオン強度で



**peak 1 peak 2 peak 3**

**Fig. 6**  
B : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the three peaks separated on Mono-Q column chromatography.  
The gel was stained with Coomassie blue.

溶出するものから順にピーク1, 2及び3とする)の $T\beta\gamma$ としての活性、すなわち、ロドプシン退色中間体存在下での $T\alpha$ のGTP結合能を促進する能力を測定した(Fig. 7)。ピーク1の $T\beta\gamma$ 画分を用いた場合、 $T\beta\gamma$ 量を反応混液中の $T\alpha$ 量の3/5量(モル比)まで増加させても、 $T\alpha$ のGppNHp結合能は、殆んど促進されなかった。それに対して、ピーク2及びピーク3の $T\beta\gamma$ 画分を用いた場合、 $T\beta\gamma$ 量が反応混液中の $T\alpha$ 量のおよそ1/20量(モル比)で $T\alpha$ のGppNHp結合量は半飽和値に達する飽和曲線が得られた(Fig. 7)。これらの結果は、 $T\beta\gamma$ には、 $T\alpha$ のGTP結合能を促進する能力の異なる活性型(ピーク2と3)と不活性型(ピーク1)が存在することを示している。また、ピーク2とピーク3の $T\beta\gamma$ 画分を用いた場合でも、 $T\alpha$ のGppNHp結合能を促進する能力において違いが認められた。

### 3-3 $T\beta\gamma$ のheterogeneityをもたらす要因の検討

$T\beta\gamma$ の3つの分子種が、Mono-Qカラムで分離されたことから、この3つの分子種の違いが $T\beta$ ,  $T\gamma$ いずれのサブユニットによるものかを明らかにするために、

8M 尿素存在下での電気泳動を行なった。この電気泳動法は、蛋白質の荷電の違いを検討する際に有効である。T $\beta\gamma$  の各分子種 (Fig. 6-A のピーク 1, 2 及び 3) を、この方法により電気泳動させた結果、各分子種の T $\beta$  の易動度は一致するがピーク 1 の T $\gamma$  とピーク 2 及び 3 の T $\gamma$  では易動度に差が認められた (Fig. 8-A)。さらに低分子蛋白質及びペプチドの解析に有効である 8M 尿素-SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった結果、各ピークに含まれる T $\gamma$  の易動度に明らかな差が認められた (Fig. 8-B)。すなわち、ピーク 1 の T $\gamma$  の易動度は 7.8 kDa に相当し、ピーク 2 及びピーク 3 の T $\gamma$  の易動度は 5.6 kDa に相当した (通常の SDS-PAGE によると、低分子蛋白質のこの程度の差は検出できない)。以上の結果、T $\beta\gamma$  の heterogeneity は主に T $\gamma$  の heterogeneity に基づくことが示唆された。

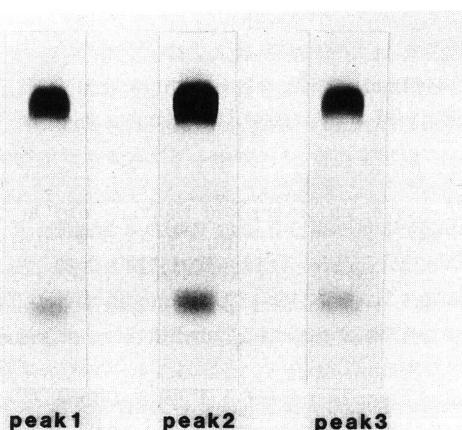
### 3・4 T $\gamma$ サブユニットの性状

T $\beta\gamma$  は生理的条件下では T $\beta$  及び T $\gamma$  それぞれ 1 分子から成る heterodimer として存在し、ある種の変性条件下でのみ両サブユニットの解離が起こる。そこで次に、T $\gamma$  の heterogeneity をさらに詳細に検討することを目的として、DEAE-Toyopearl カラムより溶出した (Fig. 4-A) T $\beta\gamma$  を 6M 塩酸グアニジンを含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) で完全変性させた後、Sephacryl S-200 カラムにより T $\beta$  から T $\gamma$  を単離した。単離した T $\gamma$  は、C18 逆相カラムを装着した HPLC でさらに分

離精製した。すなわち、0.1% トリフルオロ酢酸を含む 5% から 95% アセトニトリル直線濃度勾配で蛋白質の溶出 (流速 1 mL/min, 40 分間) を行なった (Fig. 9-A)。T $\gamma$  は C18 逆相カラムより 4 つの主ピークを呈して溶出された (カラムより先に溶出するものから順にピーク 1, 2, 3 及び 4 とした)。各ピークを 8M 尿素-SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したところ、ピーク 1 の易動度は 7.8 kDa に、他の 3 つのピークの易動度は 5.6 kDa に相当した (Fig. 9-B)。従って、8M 尿素-SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上、T $\alpha$  の GTP 結合能を促進する能力を持たない不活性型 T $\beta\gamma$  の  $\gamma$  サブユニットの易動度は T $\gamma$ -1 のそれと同一であり、活性型 T $\beta\gamma$  の  $\gamma$  サブユニットの易動度は T $\gamma$ -2, T $\gamma$ -3 及び T $\gamma$ -4 のそれと一致することを示している。

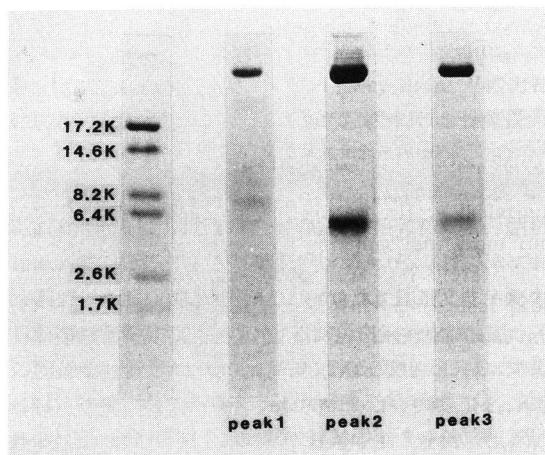
この 4 つのピーク (ピーク 1, 2, 3 及び 4 をそれぞれ T $\gamma$ -1, T $\gamma$ -2, T $\gamma$ -3 及び T $\gamma$ -4 と名付けた) を再び C18 逆相カラム (HPLC) により精製し、それぞれのアミノ酸組成を分析した。その結果、Table 1 に示すように全ての T $\gamma$  分子種のアミノ酸組成は、極めて類似しており、顕著な違いは認められなかった。さらに検討を行なう目的で、T $\gamma$ -1, T $\gamma$ -2, T $\gamma$ -3 及び T $\gamma$ -4 の N 末端側からのアミノ酸一次配列の分析及び C 末端アミノ酸の同定を行なった。T $\gamma$ -1 及び T $\gamma$ -3 の N 末端アミノ酸は Pro で、T $\gamma$ -1 と T $\gamma$ -3 はそれぞれ N 末端側から 30 番目 Met 及び 32 番目 Val までのアミノ酸

Fig. 8 Electrophoretic profiles of functionally different subspecies of T $\beta\gamma$ .



A : 8 M Urea-polyacrylamide gel electrophoresis.

Preparations of both gel and samples were described in Materials and Methods section. Peak 1 (3  $\mu$ g), peak 2 (5  $\mu$ g) or peak 3 (3  $\mu$ g) obtained by Mono-Q column chromatography (Fig. 6, A) was applied on each lane.



B : 8 M-Urea-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Preparations of both gel and samples were described in Materials and Methods section. Peak 1 (3  $\mu$ g), peak 2 (5  $\mu$ g) or peak 3 (3  $\mu$ g) obtained by Mono-Q column chromatography (Fig. 6, A) was applied on each lane.

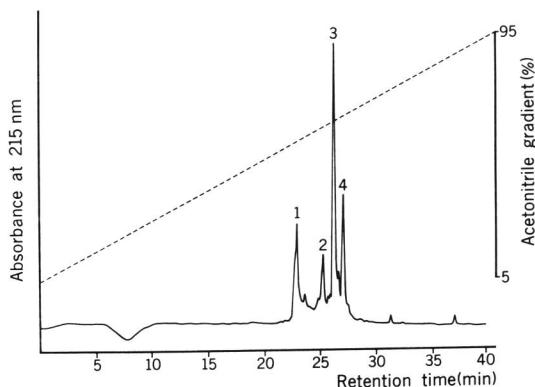


Fig. 9

A : High-performance liquid chromatographic separation of  $T\gamma$  subspecies.  $T\gamma$  was isolated from  $T\beta\gamma$  by gel filtration after denaturing with 6 M guanidine hydrochloride, followed by separation through a reverse phase C18 column (4.6 × 250 mm) equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid, and eluted with 40 ml of a linear gradient of 5–95% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid at flow rate of 1 ml/min. The proteins were detected with an absorbance at 215 nm.

Table 1 Amino acid compositions of  $T\gamma$  subspecies isolated by a reverse phase C18 column equipped with a high-performance liquid chromatography system.

	Amino acid residues/mol Peptide				
	$T\gamma$ -1	$T\gamma$ -2	$T\gamma$ -3	$T\gamma$ -4	$T\gamma^*$
Asp	8	7	9	8	8
Thr	2	2	2	2	2
Ser	2	2	2	2	2
Glu	13	13	13	13	13
Pro	4	4	5	4	4
Gly	4	5	5	5	3
Ala	0	0	0	0	0
Cys	—	—	—	—	2
Val	6	5	6	5	6
Met	2	1	2	2	2
Ile	3	3	3	3	4
Leu	7	6	7	6	6
Tyr	1	1	1	1	1
Phe	2	2	2	2	2
Lys	10	9	11	10	10
His	0	0	0	0	0
Arg	3	3	4	3	3

\* This amino acid composition was calculated from data on amino acid sequence deduced from cDNA of bovine  $T\gamma$  reported by Yatsunami *et al.*<sup>18)</sup> and Ovchinnikov *et al.*<sup>19)</sup> 68 amino acid residues from Pro<sup>2</sup> to Gly<sup>69</sup> in Yatsunami's data and from pro<sup>1</sup> to Gly<sup>68</sup> in Ovchinnikov's data were taken to calculate.

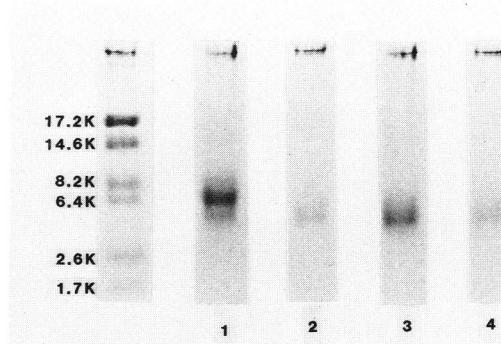


Fig. 9

B : 8 M Urea-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the peak fractions (peaks 1–4) obtained by the high-performance liquid chromatography (panel A).

Table 2 N-terminal amino acid sequence of both  $T\gamma$  subspecies and CNBr-fragments of  $T\gamma$ -3 ( $T\gamma$ -3-CNBr).

Cycle	$T\gamma$ -1	$T\gamma$ -2	$T\gamma$ -3	$T\gamma$ -3-CNBr 1	$T\gamma$ -3-CNBr 2
1	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro
2	Val	Val	Val	Val	Leu
3	Ile	Ile	Ile	?	Val
4	Asn	Asn	Asn	?	Lys
5	Ile	Ile	Ile	?	Gly
6	Glu	?	Glu	?	Ile
7	Asp	?	Asp	Glu	Pro
8	Leu	Leu	Leu	Glu	Glu
9	Thr	Thr	Thr	Phe	Asp
10	Glu	?	Glu	Arg	Lys
11	Lys	Lys	Lys	Asp	Asn
12	Asp	Asp	Asp	Tyr	Pro
13	Lys	Lys	Lys	Val	Phe
14	Leu	Leu	Leu	Glu	Lys
15	Lys	Lys	Lys	Glu	Glu
16	Met	Met	Met	Arg	Leu
17	Glu	?	Glu	Ser	Lys
18	Val	Val	Val	Gly	Gly
19	Asp	Asp	Asp	Glu	
20	Gln	Gln	Gln	Asp	
21	Leu	Leu	Leu		
22	Lys	Lys	Lys		
23	Lys	Lys	Lys		
24	Glu	Glu	Glu		
25	Val	Val	Val		
26	Thr	?	Thr		
27	Leu	Leu	Leu		
28	Glu		Glu		
29	Arg		Arg		
30	Met		Met		
31			Leu		
32			Val		

\*<sup>1</sup>: Five amino acids were not identified in  $T\gamma$ -2 subspecies.

\*<sup>2</sup>: Four amino acids were not identified in  $T\gamma$ -3-CNBr-1 fragment.

配列が解析されたが、この30番目までのアミノ酸配列は全く一致した(Table 2)。 $T\gamma$ -2はN末端側から27番目まで解析された結果、5残基のアミノ酸は同定できなかったもののその他のアミノ酸配列は、 $T\gamma$ -1,  $T\gamma$ -3と一致した。一方、 $T\gamma$ 分子種のC末端アミノ酸の同定は、carboxy peptidase-Pを用いた酵素法により検討した。その結果 $T\gamma$ -1,  $T\gamma$ -3及び $T\gamma$ -4のC末端側は、Glu-Leu-Lys-Gly COOHと推定された(Table 3)。

ウシ $T\gamma$ のアミノ酸一次配列はすでに、Hurley *et al.*<sup>18)</sup>及びYatsunami *et al.*<sup>19)</sup>がcDNAの塩基配列から、またOvchinnikov *et al.*<sup>20)</sup>がアミノ酸解析から決定している。本研究で明らかにした $T\gamma$ -1、及び $T\gamma$ -3のN末端Proから30番目Metまでのアミノ酸配列の分析結果は、Hurley *et al.*<sup>18)</sup>及びYatsunami *et al.*<sup>19)</sup>の報告した $T\gamma$ -1次配列と全く一致した(Fig. 10)。またcarboxy peptidase-Pを用いた酵素法により推定された $T\gamma$ -1,  $T\gamma$ -3,  $T\gamma$ -4のGlu-Leu-Lys-Gly COOHは、彼らの報告した1次配列のN末端側から数えて66番目から69番目に一致した(Fig. 10)。

#### 4 考 察

脊椎動物の視細胞桿体外節における光刺激の受容と伝達は、Fig. 11に示す過程で進行すると考えられている。すなわち、光受容体であるロドプシンの光吸収により活性化されたトランスデューションがホスホジエステラーゼを活性化すると、細胞質中のcGMP濃度が減少し、細胞形質膜上のカチオンチャンネルが閉鎖して受容器電位が発生する<sup>1,2)</sup>。1分子のロドプシンの退色に伴って、約500分子ものトランスデューションが活性化されるので、トランスデューションは光刺激伝達の初期過程におけるセカンドメッセンジャーであると同時に、このカスケードにおける增幅因子としても機能している<sup>4)</sup>。

本研究においては、 $T\beta\gamma$ には表面荷電の異なった少なくとも3つの分子種が存在することが明らかとなった。これらの $T\beta\gamma$ の1つの分子種は、ロドプシンの退色中間体存在下においても、 $T\alpha$ のGTP結合能をほとんど促進しない不活性型分子種であった。すなわち $T\beta\gamma$ には機能的に異なる活性型及び不活性型分子種が存在することが、明らかにされた。

機能的に異なる $T\beta\gamma$ 分子種の構造的差異を明らかにする目的で、8M尿素-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及び8M尿素-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。その結果、活性型 $T\beta\gamma$ と不活性型 $T\beta\gamma$ にお

Table 3 Analysis of C-terminal amino acids of  $T\gamma$  subspecies by carboxypeptidase P treatment.

	Amino acids released (mol/mol Peptide)					
	$T\gamma$ -1			$T\gamma$ -3		$T\gamma$ -4
	3 min	5 min	30 min	5 min	180 min	30 min
Gly	0.30	0.53	1.00	0.53	0.76	0.80
Lys	0.23	0.44	1.45	0.30	0.90	1.20
Leu	—	0.23	1.00	0.53	1.10	0.83
Glu	—	—	0.80	—	1.00	0.66

Subspecies of  $T\gamma$  were isolated by a reverse phase C18 column equipped with a high-performance liquid chromatography system as described in the text. Each purified  $T\gamma$  subspecies was mixed with carboxypeptidase P in 50 mM CH<sub>3</sub>COONa, 0.5% Triton X-100 (pH 4.6) and incubated for 3, 5, 30 or 180 min at room temperature. The cleavage reaction was terminated by adding 0.02 M HCl. The amino acids released were identified and quantified using an automatic amino acid analyzer.

いて、それぞれ $\gamma$ サブユニットの易動度が異なるという知見が得られた。そこで、活性型及び不活性型両者の $T\gamma$ を単離したところ、活性型 $T\gamma$ は、C18逆相カラムによってさらに3つの分子種( $T\gamma$ -2,  $T\gamma$ -3及び $T\gamma$ -4)に分離された。そこでこれらの各 $T\gamma$ 分子種についてアミノ酸組成分析、C末端アミノ酸分析及びN末端側からアミノ酸一次配列分析を行なった。その結果、いずれの $T\gamma$ の分子種もアミノ酸組成に違いは認められなかった。8M尿素-SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上、活性型 $T\beta\gamma$ の $\gamma$ サブユニットは、5.6 kDa、及び不活性型 $T\beta\gamma$ の $\gamma$ サブユニットは、7.8 kDaに相当する易動度を示すが、この易動度の差異は両者の一次構造の違いによるのではなく、おそらく蛋白質( $T\beta\gamma$ )表面荷電の違いをもたらす構造修飾の結果ではないかと考えられる。

Hurley *et al.*<sup>18)</sup>及びYatsunami *et al.*<sup>19)</sup>は遺伝子解析からの $T\gamma$ の一次構造を推定した。その結果、 $T\gamma$ は、N末端及びC末端アミノ酸にそれぞれMet及びSerをもつ74個のアミノ酸より構成されていると報告している。一方Ovchinnikov *et al.*<sup>20)</sup>は、蛋白質化学的な解析から $T\gamma$ の一次構造を決定したが、その $T\gamma$ の1次構造は、Hurley *et al.*<sup>18)</sup>及びYatsunami *et al.*<sup>19)</sup>が報告した一次構造のN端から2番目Proから70番目Glyまでの配列中、49番目GlyだけがHurley *et al.*<sup>18)</sup>の報告と異なるものの、Yatsunami *et al.*<sup>19)</sup>の報告と全く一致するものであった(Fig. 10)。しかし、本研究では、carboxy peptidase-Pを用いて行なった酵素法による $T\gamma$ 分子種のC末端アミノ酸分析の結果、C末端のアミノ酸配列は各 $T\gamma$ 分子種において、全てが

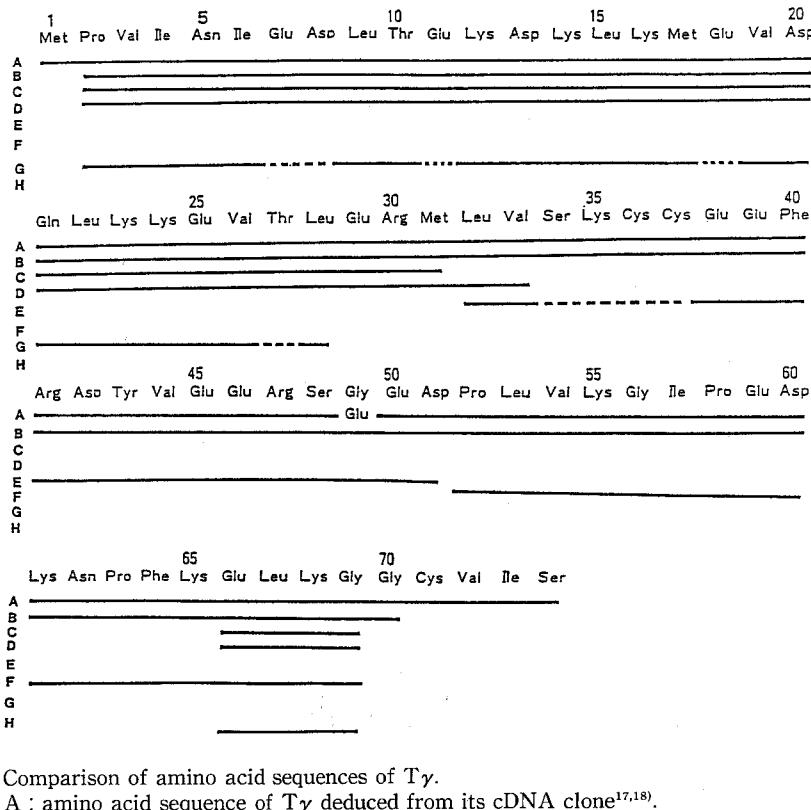


Fig. 10 Comparison of amino acid sequences of T<sub>γ</sub>.

A : amino acid sequence of T<sub>γ</sub> deduced from its cDNA clone<sup>17,18)</sup>.

B : amino acid sequence of T<sub>γ</sub> determined by peptide sequencer after partial digestion<sup>19)</sup>.

C : T<sub>γ</sub>-1

D : T<sub>γ</sub>-3

E : peptide fragment obtained by CNBr treatment of T<sub>γ</sub>-3 (T<sub>γ</sub>-3-CNBr-1)

F : peptide fragment obtained by CNBr treatment of T<sub>γ</sub>-3 (T<sub>γ</sub>-3-CNBr-2)

G : T<sub>γ</sub>-2

H : T<sub>γ</sub>-4

— : identified amino acid sequence.

- - - - : unidentified portions of amino acid sequence.

Glu-Leu-Lys-Gly COOH であり、既知の報告と比較すると Hurley *et al.*<sup>18)</sup> 及び Yatsunami *et al.*<sup>19)</sup> の報告より N 末端側アミノ酸が 1 残基及び C 末端側アミノ酸が 5 残基短く、Ovchinnikov *et al.*<sup>20)</sup> の報告よりもさらに 1 残基短いものであった (Fig. 10)。さらに、T<sub>γ</sub>-3 をプロモシアン処理後、HPLC で精製して得られたペプチド断片のうち 2 つの断片の N 末端側からのアミノ酸配列が分析されている。その結果、これらの断片の N 末端側からのアミノ酸配列は、4 残基のアミノ酸が同定できなかったものの、その他は、Ovchinnikov *et al.*<sup>20)</sup> が報告した 31 番目 Leu から 50 番目 Asp のアミノ酸配列及び 51 番目 Pro から 69 番目 Gly のアミノ酸配列と一致した (Fig. 10)。従って、本研究で得られた各 T<sub>γ</sub> 分子種は N 末端を Pro 及び C 末端を Gly とするアミノ酸 68 個より構成されていると推定された。

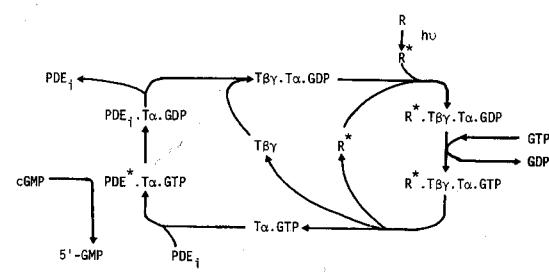


Fig. 11 Light-activated cGMP cascade of visual transduction process.

R : rhodopsin, R\* : photolyzed rhodopsin, T<sub>α</sub> and T<sub>βγ</sub> : subunits of transducin, PDE<sub>i</sub> : inactive form of cGMP-phosphodiesterase, PDE\* : active form of cGMP-phosphodiesterase.

すなわち遺伝子レベルにおいて  $T\gamma$  は、74 個のアミノ酸から構成される蛋白質として合成された後、細胞内プロセシングを受けて 68 個のアミノ酸から成る蛋白質に変換されて生理活性を持つようになると考えられた。

さて、視細胞内でのロドプシンからの光情報伝達の系は、ホルモン受容体と極めて近い関係にあることが示されている。第 1 は、受容体自身の構造に関するもので、光受容体ロドプシンと  $\beta$ -アドレナリン性受容体蛋白質に部分的なアミノ酸配列の類似が認められることや、両者の蛋白質が 7 本の  $\alpha$  ヘリックスを形成して膜を貫通していることである<sup>21)</sup>。また両受容体ともに特異的なリン酸化酵素によってリン酸化され、その結果として、受容体自身の情報伝達能力が低下する<sup>22)</sup>と報告されている。興味深いことに、両方の系には互換性があり、ロドプシンキナーゼが  $\beta$  受容体を、 $\beta$  受容体キナーゼがロドプシンをリン酸化すること<sup>22)</sup>が示されている。第 2 は情報伝達機構に関するもので、両方の系においては、共に GTP 結合蛋白質が情報伝達因子(トランスデューサー)として機能している。ホルモン受容体に共役する GTP 結合蛋白質( $N_s$  及び  $N_i$ )の  $\beta$  サブユニットと  $T\beta$  は共通であること<sup>23)</sup>が示されている。しかし、トランスデューションと他の GTP 結合蛋白質との大きな違いは、ある条件で  $T\beta\gamma$  が水溶性画分に移行するのに対し、 $N_s$  及び  $N_i$  の  $\beta\gamma$  サブユニットは、水溶性画分に移行しないという点である。このような違いは、両者の  $\gamma$  サブユニットが異なるためであると考えられている。Hildebrandt *et al.*<sup>24)</sup> は、 $N_s$ 、 $N_i$  及びトランスデューションの  $\beta\gamma$  サブユニットのペプチドマッピングを行なった結果、 $N_s$ 、 $N_i$  及びトランスデューションの  $\beta$  サブユニットは同様のマッピングパターンを示すが、 $\gamma$  サブユニットのパターンは全く異なっていることを報告した。 $T\gamma$  の生理的役割は現在のところ明らかではないが、これらの事実から、 $T\gamma$  は  $T\beta\gamma$  と膜もしくはロドプシン退色中間体との結合に対して重要な役割を担っている可能性が考えられる。Yamazaki *et al.*<sup>25,26)</sup>、Ho and Fung<sup>27)</sup> 及び Fung and Nash<sup>28)</sup> は、NEM (N-ethylmaleimide) で化学修飾した  $T\beta\gamma$  や、トリプシン処理後の  $T\beta\gamma$  を用いて、それらの  $T\alpha$  の GTP 結合能に対する促進効果を検討した。その結果、 $\beta$  サブユニットの修飾による  $T\alpha$  の GTP 結合能が抑制されることを報告している。しかしながら、 $T\gamma$  についてはそのような報告はない。本研究において活性型及び不活性型  $T\beta\gamma$  の機能的違いが  $T\gamma$  の違いに基づくことを見出した。つまり  $T\gamma$  の違いによって  $T\beta\gamma$  の活性が調節されている事実を明らかにしたのは本研究が最

初である。

不活性型  $T\beta\gamma$  の生理的意義については、いくつかの可能性が考えられる。Yamazaki *et al.*<sup>25,26)</sup> は、視細胞桿体の GTP 結合タンパク質の  $\beta\gamma$  サブユニットが、 $\alpha$  サブユニットの GTP 結合能に対して促進的に作用するだけでなく、 $T\alpha$  のもつ GTPase 活性に対しても促進的に作用することを報告している。著者らの見出した不活性型の  $T\beta\gamma$  は、このような  $T\alpha$  の GTPase 活性に対して促進的に作用する分子種である可能性も考えられる。もしさうであるならば、 $T\alpha$  の GTPase 活性は視興奮過程において、情報発現抑制(スイッチ・オフ)の作用をもつので、活性型及び不活性型  $T\beta\gamma$  の切り替えが視興奮のオン・オフの調節を担っている可能性が考えられよう。Logothetis *et al.*<sup>29)</sup> は、GTP 結合タンパク質の  $\beta\gamma$  サブユニットが、心房細胞の  $K^+$  チャンネルに直接作用し、その開閉を抑制している可能性を示唆した。このアナロジーで考えると不活性型  $T\beta\gamma$  が、カチオンチャネルに直接作用して受容器電位発生の調節を担っている可能性もあるかも知れない。またさきに述べた  $N_s$  の  $\beta\gamma$  サブユニットは、それ自身がアデニル酸シクラーゼ活性を抑制する活性を有している。光受容体とホルモン受容体系の高い類似性を考慮にいれると、不活性型  $T\beta\gamma$  が直接 cGMP ホスホジエステラーゼを抑制する可能性も否定はできない。Fukada and Akino<sup>30)</sup> は、 $T\alpha$  及び  $T\beta\gamma$  に対するポリ及びモノクローナル抗体を作製し、これらを用いた免疫組織学的検討により、 $T\alpha$  及び  $T\beta\gamma$  が錐体外節にも存在することを明らかにした。このことより色覚に関与する錐体視細胞においても、トランスデューションを介して光情報が伝達、増幅されている可能性を示唆している。Haynes and Yau<sup>31)</sup> は、錐体外節形質膜のカチオンチャネルも cGMP により開閉が制御されていることを示し、また、Hurwitz *et al.*<sup>32)</sup> は錐体外節にも cGMP ホスホジエステラーゼが存在し、桿体外節と同様な視興奮過程が存在することを示唆している。これらのこと考慮にいれると、もう 1 つの可能性として、見かけ上不活性型の  $T\beta\gamma$  が錐体外節由来の  $T\beta\gamma$  であることも考えられる。 $T\gamma$  分子種に異なった表面荷電の変化をもたらす構造修飾の解析とともに、 $T\beta\gamma$  の複数分子種の生理的意義の解明が、今後の課題である。

## 5 結論

本研究は、視興奮の初期過程における GTP 結合蛋白質、とくに  $\beta\gamma$  サブユニットの役割を検討すること目的として行ない次の結果を得た。

- 1)  $T\beta\gamma$  には、 $T\alpha$  の GTP 結合能を促進する活性をもつ活性型  $T\beta\gamma$  と、そのような活性をもたない不活性型  $T\beta\gamma$  の存在を明らかにし、それらを Mono-Q カラムクロマトグラフィを用いて分離することに成功した。
- 2) 活性型及び不活性型  $T\beta\gamma$  分子種の構造的差異は、 $T\gamma$  の違いによることが 8M 尿素-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及び 8M 尿素-SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により明らかとなった。
- 3) 不活性型  $T\beta\gamma$  由来の  $T\gamma-1$  及び活性型  $T\beta\gamma$  由来の  $T\gamma-2$ ,  $T\gamma-3$  及び  $T\gamma-4$  の 4 つの  $T\gamma$  分子種の存在を明らかにし、逆相カラム(HPLC)により、それらの単離に成功した。
- 4)  $T\gamma$  分子種 ( $T\gamma-1$ ,  $T\gamma-2$ ,  $T\gamma-3$ , 及び  $T\gamma-4$ ) の構造的差異を明らかにするために、単離した各  $T\gamma$  分子種のアミノ酸組成分析、N 末端側からのアミノ酸配列の分析、及び C 末端アミノ酸配列の分析を行なった。 $T\gamma-3$  については、プロモシアン分解した後、得られたペプチド断片の N 末端からのアミノ酸配列の分析を行なった。その結果、各  $T\gamma$  分子種共に N 末端を Pro 及び C 末端を Gly とする 68 個のアミノ酸残基より構成されると推定された。従って、各  $T\gamma$  分子種の構造的な違いは、蛋白質の表面荷電に違いをもたらす構造化学修飾に基づくと考えられた。

### 謝 詞

本研究を行なうにあたり、終始懇切丁寧に御指導いただきました本学生化学第一講座秋野豊明教授並びに本学眼科学講座中川喬教授に深く感謝します。また終始有益な御助言を賜りました本学生化学第一講座の諸先生方に感謝します。網膜単離のために研究室の使用を許可いただきました京都大学理学部生物物理学教室吉澤透教授並びにアミノ酸分析に関しまして御教示いただきました北海道大学免疫科学研究所生化学部門塩川洋之教授、水野佑亮助教授に感謝します。

本研究は文部省科学研究費重点領域研究「光受容の分子機構」(秋野)の補助を受けた。また要旨は第 60 回日本生化学会において発表した。

### 文 献

1. 古澤透、深田吉孝： 視覚の初期過程と膜。 化学増刊 **101**, 125-144 (1983).
2. Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S. and Lyubarsky, A. L.: Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. Nature **313**, 310-313 (1985).
3. Kühn, H.: Light-and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes. Nature **283**, 587-589 (1980).
4. Fung, B. K. -K. and Stryer, L.: Photolyzed rhodopsin catalyzes the exchange of GTP for bound GDP in retinal rod outer segments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 2500-2504 (1980).
5. Yee, R. and Liebman, P. A.: Light-activated phosphodiesterase of the rod outer segments. J. Biol. Chem. **253**, 8902-8909 (1978).
6. Zimmerman, A. L., Yamanaka, G., Eckstein, F., Baylor, D. A. and Stryer, L.: Interaction of hydrolysis-resistant analogs of cyclic GMP with the phosphodiesterase and light-sensitive channel of retinal rod outer segments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 8813-8817 (1985).
7. 大黒浩、斎藤雅哉、深田吉孝、秋野豊明： 視細胞桿体外節 GTP 結合タンパク質の複数の分子種。 あたらしい眼科 **4**, 877-880 (1987).
8. Fukada, Y., Kawamura, S., Yoshizawa, T. and Miki, N.: Activation of phosphodiesterase in frog rod outer segment by an intermediate of rhodopsin photolysis I. Biochim. Biophys. Acta **675**, 188-194 (1981).
9. Fung, B. K. -K.: Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. J. Biol. Chem. **258**, 10495-10502 (1983).
10. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature **227**, 680-685 (1970).
11. Perrin, W. T. and Perry, S. V.: An electrophoretic study of the low-molecular-weight components of myosin. Biochem. J. **119**, 31-38 (1970).
12. Swank, R. T. and Munkres, K. D.: Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. Anal. Biochem. **39**, 462-477 (1971).
13. Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. and Dreyer, W. J.: A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. J. Biol. Chem. **256**, 7990-7997 (1981).
14. Yokoyama, S., Oobayashi, A., Tanabe, O. and Ichishima, E.: Action of crystalline acid carboxypeptidase from *Penicillium janthinellum*. Biochim. Biophys. Acta **397**, 443-448 (1975).
15. Yokoyama, S., Oobayashi, A., Tanabe, O., Ohata, K., Shibata, Y. and Ichishima, E.: Kinase and anti-inflammatory activities of acid carboxypeptidase from *Penicillium janthinellum*.

- Experimentia **31**, 1122-1124 (1975).
16. Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**, 248-254 (1976).
  17. Bensadoun, A. and Weinstein, D.: Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal. Biochem. **70**, 241-250 (1976).
  18. Hurley, J. B., Fong, H. K. W., Teplow, D. B., Dreyer, W. J. and Simon, M. I.: Isolation and characterization of a cDNA clone for the  $\gamma$  subunit of bovine retinal transducin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 6948-6952 (1984).
  19. Yatsunami, K., Pandya, B. V., Oprian, D. D. and Khorana, H. G.: cDNA-derived amino acid sequence of the  $\gamma$  subunit of GTPase from rod outer segments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 1936-1940 (1985).
  20. Ovchinnikov, Y. A., Lipkin, V. M., Shubaeva, T. M., Bogachuk, A. K. and Shemyakin, V. V.: Complete amino acid sequence of  $\gamma$ -subunit of the GTP-binding protein from cattle retina. FEBS Lett. **179**, 107-110 (1982).
  21. Ovchinnikov, Y. A.: Rhodopsin and bacteriorhodopsin, structure-function relationships. FEBS Lett. **148**, 19-191 (1982).
  22. Emeis, D., Kühn, H., Reichert, J. and Hofmann, K. P.: Complex formation between metarhodopsin II and GTP-binding protein in bovine photoreceptor membrane leads to a shift of the photo-product. FEBS Lett. **143**, 29-34 (1982).
  23. Katada, T., Bokoch, G. M., Northup, J. K., Ui, M. and Gilman, A. G.: The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. J. Biol. Chem. **259**, 3568-3577 (1984).
  24. Hildebrandt, J. D., Codina, J., Rosenthal, W., Birnbaumer, L., Neer, E. J., Yamazaki, A. and Bitensky, M. W.: Characterization by two-dimensional peptide mapping of the  $\gamma$  subunits of Ns and Ni, the regulatory proteins of adenylyl cyclase, and of transducin, the guanine nucleotide-binding protein of rod outer segments of eyes. J. Biol. Chem. **260**, 14867-14872 (1985).
  25. Yamazaki, A., Tatsumi, M., Torney, D. C. and Bitensky, M. W.: The GTP-binding protein of rod outer segments I. J. Biol. Chem. **262**, 9316-9323 (1987).
  26. Yamazaki, A., Bitensky, M. W. and Garcia-Sainz, J. A.: The GTP-binding protein of rod outer segments II. J. Biol. Chem. **262**, 9324-9331 (1987).
  27. Ho, Y.-K. and Fung, B. K.-K.: Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. J. Biol. Chem. **259**, 6694-6699 (1984).
  28. Fung, B. K.-K. and Nash, C. R.: Characterization of transducin from bovine rod outer segments. J. Biol. Chem. **258**, 10503-10510 (1983).
  29. Logothetis, D. E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E. J. and Clapham, D. E.: The  $\beta\gamma$  subunits of GTP-bindug proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. Nature **325**, 321-326 (1987).
  30. Fukada, Y. and Akino, T.: Immunohistochemical studies on localization of GTP-binding protein in vertebrate retina. Photobiocem. Photobiophys. **11**, 269-279 (1986).
  31. Haynes, L. and Yau, K. W.: Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones. Nature **317**, 61-64 (1985).
  32. Hurwitz, R. L., Bunt-Milam, A. H., Chang, M. L. and Beavo, J. A.: cGMP phosphodiesterase in rod and cone outer segments of retina, J. Biol. Chem. **260**, 568-573 (1985).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学眼科学講座 大黒 浩