

ロドプシンのリン酸化反応を制御する  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質  
リカバリンの作用機構とN末端脂肪酸修飾の役割

真田 佳門

①

学位論文

ロドプシンのリン酸化反応を制御するCa<sup>2+</sup> 結合蛋白質  
リカバリンの作用機構とN末端脂肪酸修飾の役割

東京大学 総合文化研究科  
広域科学専攻

真田 佳門

## 目次

目次	1
本文で用いた略語	2
1. 序論	3
【1-1】 視興奮過程	
【1-2】 視興奮からの回復過程	
【1-3】 明順応におけるCa <sup>2+</sup> /リカバリンの役割	
【1-4】 リカバリンのN末端脂肪酸修飾	
【1-5】 未解決の問題点	
2. 材料と方法	11
【2-1】 緩衝液	
【2-2】 視細胞外節膜の調製	
【2-3】 リカバリンの精製	
【2-4】 N末端脂肪酸構造の異なるリカバリンの分離・精製	
【2-5】 ロドプシンキナーゼの精製	
【2-6】 Urea-washed ROSの調製	
【2-7】 βアドレナリン受容体の調製	
【2-8】 受容体キナーゼによる受容体のリン酸化反応	
【2-9】 Ca/EGTA Bufferの調製	
【2-10】 提供された試料	
【2-11】 その他の方法	
3. 結果	22
『N末端の不均一な脂肪酸構造がリカバリンの機能に及ぼす効果』	
【3-1】 N末端の脂肪酸構造の異なるリカバリンの分離	
【3-2】 N末端脂肪酸の異なるリカバリンのCa <sup>2+</sup> 結合能	
【3-3】 N末端の脂肪酸構造がリカバリンの機能に及ぼす影響	
【3-4】 N末端の脂肪酸構造がリカバリンの膜結合性に及ぼす影響	
『リカバリンの作用機構と膜結合性の役割』	
【3-5】 リカバリンの標的蛋白質の同定	
【3-6】 リカバリン/ロドプシンキナーゼ複合体の膜局在	
4. 考察	44
【4-1】 N末端の不均一な脂肪酸修飾のプロセス	
【4-2】 不均一なN末端修飾がリカバリンの機能に及ぼす影響	
【4-3】 リカバリンの作用機構	
【4-4】 不均一なN末端修飾の生理的意味	
【4-5】 リカバリン類似蛋白質の生体における役割	
5. 謝辞	51
6. 引用文献	52

本文で用いた略語

cGMP	cyclic guanosine-3', 5'- monophosphate
DTT	dithiothreitol
EGTA	ethylene glycol bis ( $\beta$ -aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid
FAB	fast atom bombardment
FPLC	fast protein liquid chromatography
ROS	rod outer segment membranes
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
TFA	trifluoroacetic acid

## 1. 序論

脊椎動物の網膜には外界の光を捕捉し、電気信号を発生する視細胞が存在する。視細胞内の光情報伝達は、cGMPを細胞内情報伝達物質として成り立っており、暗時は、視細胞内のcGMP濃度は高く(60~100  $\mu$ M)保たれている。そのため、形質膜のcGMP依存性カチオンチャンネルはcGMPと結合して開いており、Naイオン( $\text{Na}^+$ )が細胞内へ流入する内向き暗電流が観察される。ここで、視細胞に光が到達すると、細胞内cGMP濃度が激減してカチオンチャンネルが閉鎖し、外節膜を横切る電流は停止する。しかし、視細胞内節からの $\text{Na}^+$ の排出は続いているので、視細胞は過分極性の受容器電位を発生する(視興奮)。

視興奮過程の研究において、当初はcGMPとCaイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )のいずれが情報伝達物質であるのか激しい論争が続いた。しかし、cGMP依存性カチオンチャンネルの発見によってcGMPが伝達物質であることが確定し、視興奮過程における $\text{Ca}^{2+}$ の光情報伝達物質としての役割は否定された。ところが、その後の研究により $\text{Ca}^{2+}$ は「視細胞の光感度の調節」という重要な役割を果たしていることが明らかになった。以下に、cGMPをセカンドメッセンジャーとする光情報伝達の中心経路と、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の濃度変化による光感度の調節機構について述べる。

### 【1-1】視興奮過程

桿体の外節には、脂質二分子膜から成る円板と呼ばれる構造体が数百枚積み重なっており、光受容体であるロドプシンは円板膜を貫通して存在する。ロドプシンは7回膜貫通型の典型的なG蛋白質共役受容体であり、ロドプシンと共役するG蛋白質はトランスデューシンと呼ばれる。トランスデューシンは、 $\alpha\beta\gamma$ サブユニット(それぞれ $T\alpha$ 、 $T\beta$ および $T\gamma$ と略)から成る三量体G蛋白質であり、 $T\alpha$ がGDPあるいはGTPと結合し、 $T\beta\gamma$ はGDP/GTP交換反応に必須なサブユニットである。またトランスデューシンの標的蛋白質であるcGMP分解酵素(cGMP phosphodiesterase; cGMP-PDEと略)は4つのサブユニット( $PDE\alpha$ 、 $PDE\beta$ と2つの $PDE\gamma$ )から成り、その活性は $PDE\gamma$ によって抑制されている。ロドプシンが光を吸収して活性中間体メタロドプシンII(メタII中間体と略)に変化すると、トランスデューシンと複合体を形成し、 $T\alpha$ に結合しているGDPと細胞質中のGTPとの交換反応が促進される。その結果、 $T\alpha$ -GTPは活性複合体から解離する。このようにして生成した $T\alpha$ -GTPは $PDE\gamma$ と結合し、 $PDE\gamma$ によるcGMP-PDE活性の抑制が解除される。このcGMP-PDEの活性化により視細胞内のcGMP濃度が減少し、形質膜に存在するcGMP依存性カチオンチャンネル(Fesenko *et al.*, 1985)が閉鎖して視興奮が起こる(図1)。この一連の情報伝達過程において、一分子のメタII中間体の触媒作用によって約500分子の $T\alpha$ -GTPが生成し(Fung *et al.*, 1981)、一分子のcGMP-PDEは一秒あたり数百分子のcGMPを分解するという2段階の増幅

メカニズムがあるため、視細胞はきわめて微弱な光に対しても応答できる。

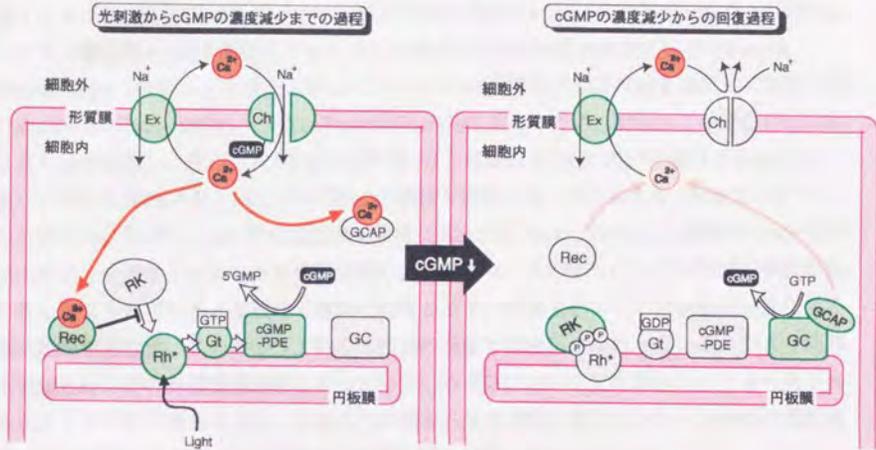


図1 視細胞における光情報伝達の $Ca^{2+}$ による制御

細胞内の $Ca^{2+}$ 濃度は、cGMP依存性カチオンチャンネル(Ch)を通して流入する $Ca^{2+}$ と $Na^{+}/Ca^{2+}-K^{+}$ 交換体(Ex)により排出される $Ca^{2+}$ のバランスにより調節されている。暗状態では細胞内の $Ca^{2+}$ 濃度は高く保たれており、細胞内 $Ca^{2+}$ はリカバリン(Rec)・グアニル酸シクラーゼ活性化蛋白質(GCAP)という $Ca^{2+}$ 結合蛋白質を介してcGMPカスケードを巧妙に調節している。ここで、ロドプシンが光を吸収すると、一連のcGMPカスケード[メタII中間体(Rh\*)→トランスデュシン(Gt)→cGMP分解酵素(cGMP-PDE)]が活性化され、細胞内cGMP濃度が減少する(図の左側)。その結果、cGMP依存性カチオンチャンネルからcGMPが遊離して形質膜のカチオンコンダクタンスが減少し、過分極性の膜電位変化が生じる(視興奮)。これと並行して細胞内の $Ca^{2+}$ 濃度は減少し、リカバリンの不活性化によるRh\*の不活性化、GCAPの活性化によるGCの活性化が起こる(図の右側)。これら一連の反応を介して、視興奮は速やかに回復する。緑色で示した蛋白質は活性化状態を表している。2種類の $Ca^{2+}$ 結合蛋白質には、それぞれ複数の $Ca^{2+}$ が結合するが、ここでは模式的に1つだけ表した。

### 【1-2】 視興奮からの回復過程

視細胞が外界の光環境に瞬時に対応するためには、前述のように、光情報を増幅伝達すると同時に、その情報伝達を迅速に遮断しなくてはならない。視細胞桿体の場合、情報伝達の各段階に精密な情報停止機構が存在する。一般に、G蛋白質共役受容体が受容体特異的キナーゼによってリン酸化されると細胞の脱感作が起こる。ロドプシンは光退色すると、C末端領域に存在するセリンおよびスレオニン残基がG蛋白質共役受容体キナーゼの1つであるロドプシンキナーゼによってリン酸化される (Kühn *et al.*, 1973; Ohguro *et al.*, 1993)。このリン酸化型メタII中間体にアレスチンと呼ばれる48kDa蛋白質が結合 (Bennett & Sitaramayya, 1988)し、トランスデューシンとメタII中間体の相互作用を拮抗的に阻害する (Palczewski *et al.*, 1992b)。一方、 $T\alpha$ はGTPase活性をもつため、結合しているGTPをGDPに自ら加水分解し、生成した $T\alpha$ -GDPは $PDE\gamma$ から解離して $T\beta\gamma$ と再び三量体を形成する。また、 $T\alpha$ から解放された $PDE\gamma$ は $PDE\alpha\beta$ の活性を抑制する。このようなcGMPカスケードの不活性化と同時に、cGMP合成酵素が活性化(Koch & Stryer, 1988)して細胞内cGMP濃度が上昇し、カチオンチャンネルは再び開く。現在では、このようにして光情報の遮断が起こると考えられている。視細胞の重要な特性として、背景光によって光感受性が変化する順応現象があるが、この現象は上記の光情報の遮断と密接にかかわっている。つまり明順応現象とは、前の光情報を遮断しようとしている状態において光刺激されたときに見られる光応答の特性と考えられる。このような刺激に対する順応機構、あるいは情報の遮断機構には、以下に述べるように細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度変化が深く関与している。

### 【1-3】 明順応における $Ca^{2+}$ /リカバリンの役割

形質膜に存在するcGMP依存性カチオンチャンネルのイオン選択性は低く、 $Na^+$ と同時に $Ca^{2+}$ も細胞内に流入する(図1)。また形質膜には $Na^+ / Ca^{2+} - K^+$ 交換体が存在し、恒常的に細胞内の $Ca^{2+}$ を細胞外に汲みだしている(Yau & Nakatani, 1985; Cervetto *et al.*, 1986)。この両者のバランスによって、暗時の細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度は一定(約1  $\mu M$ )に保たれている。ところが明時には、光刺激によるチャンネルの閉鎖によって $Ca^{2+}$ の流入が減少するので細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度は低下する。このような細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の変化は、視細胞の順応機構に深く関与していることが以下の実験によって示された。すなわち、細胞外液の $Na^+$ イオンを $Li^+$ イオンに交換すると、 $Na^+ / Ca^{2+} - K^+$ 交換体が働かなくなるため、光刺激によって細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度は低下せず一定に保たれる。この状態において視細胞の光応答を調べると、順応現象が観察されなかった(Matthews *et al.*, 1988; Nakatani & Yau, 1988)。つまり、明順応現象には $Ca^{2+}$ の細胞内濃度変化が必須であると考えられた。

前述したように、視細胞の光応答は細胞内のcGMP濃度の低下によって生じる。したがって、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の低下によってcGMPの合成系(グアニル酸シクラーゼ)が活性化するか、

または分解系(cGMP-PDE)が抑制されると、光情報が速やかに遮断されるので、その結果として明順応が生じると考えられる。事実、視細胞外節膜の懸濁液を用いて、cGMP合成酵素の活性を測定すると、Ca<sup>2+</sup>濃度が高いときは活性が低く、Ca<sup>2+</sup>濃度の低下に伴って活性化されることが1988年に示された(Koch & Stryer, 1988)。つまり細胞内では、cGMP合成酵素の活性は明時(低Ca<sup>2+</sup>濃度)に高く、光刺激に伴ってcGMP-PDEによって加水分解されたcGMPが活発に再合成されることになる(図1)。その結果として、光応答が速やかに停止する。この過程に關与する因子としてGCAP(guanylyl cyclase-activating protein; グアニル酸シクラーゼ活性化蛋白質)と呼ばれる視細胞に特異的なCa<sup>2+</sup>結合蛋白質が同定され(Gorczyca *et al.*, 1994; Gorczyca *et al.*, 1995)、Ca<sup>2+</sup>が結合していないGCAPがcGMP合成酵素を直接的に活性化する(Dizhoor *et al.*, 1994; Palczewski *et al.*, 1995)。一方、視細胞外節を用いて、電気生理学的にcGMP-PDE活性を測定すると、高Ca<sup>2+</sup>濃度の場合には低Ca<sup>2+</sup>濃度に比べて、cGMP-PDEの活性化効率が高く、活性化状態が長く持続することが明らかになった(Kawamura & Bownds, 1981)。したがって細胞内では、暗時(高Ca<sup>2+</sup>濃度)は光感受性が高く、明時(低Ca<sup>2+</sup>濃度)には光感受性が低下すると考えられる。つまりこの現象は明順応機構をうまく説明できる。この現象に關与する蛋白質としてウシ視細胞からリカバリン<sup>1)</sup>(Dizhoor *et al.*, 1991; Lambrecht & Koch, 1991)が、またカエル視細胞からS-モデュリン(Kawamura & Murakami, 1991)が見出された。

リカバリン/S-モデュリンは、視細胞に特異的な分子量26,000のCa<sup>2+</sup>結合蛋白質であり、分子内に2つのCa<sup>2+</sup>結合部位を持つ。細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度が高い時、リカバリン/S-モデュリンはロドプシンのリン酸化反応を抑制し(Kawamura, 1992b)、視細胞の光感度を調節する(Gray-Keller *et al.*, 1993)。つまり、暗順応した視細胞では細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が高く、リカバリン/S-モデュリンはCa<sup>2+</sup>結合型で存在するため、ロドプシンが光を吸収してメタII中間体が生成してもリン酸化反応が抑制されている(図2)。その結果、メタII中間体の不活性化が抑えられるため、cGMPカスケードにより光信号が効率的に増幅される(光感受性が高い)。ところが、光刺激と共にCa<sup>2+</sup>濃度が低下しはじめると、リカバリン/S-モデュリンからCa<sup>2+</sup>が遊離するため、メタII中間体のリン酸化反応の抑制が解除される。したがって、光刺激の直後からロドプシンの不活性化が速やかに起こり、cGMPカスケードへの情報伝達効率が減少して光感受性が低下する(図2)。このように、リカバリン/S-モデュリンは視細胞の明暗順応過程において中心的な役割を果している。

<sup>1)</sup> リカバリンは当初、cGMP合成酵素の活性をCa<sup>2+</sup>濃度依存的に制御する蛋白質と報告された(Dizhoor *et al.*, 1991)。しかしその後、同じグループが自らの報告は誤りであったことを認めた(Hurley *et al.*, 1993)。すなわち、彼らが実験に用いたリカバリン画分にGCAP(上記参照)が混在しており、この蛋白質がcGMP合成酵素活性を制御していたことが判明した(第16回 谷口シンポジウム 視覚神経生物学部門 要旨集, 1993)。

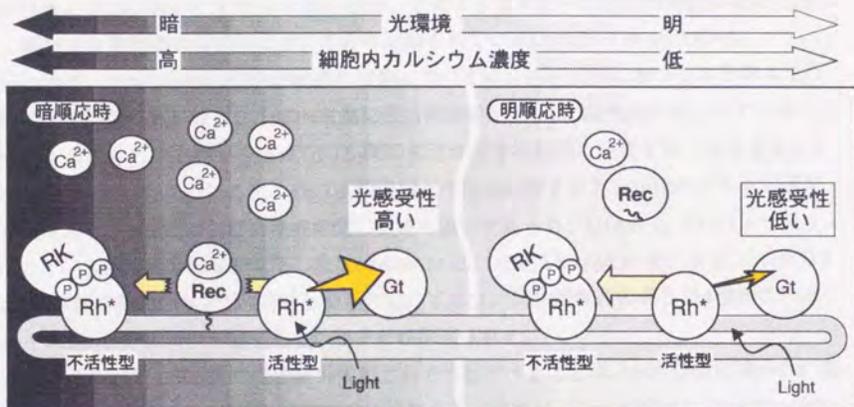


図2 明暗順応時における視細胞の光感受性の変化とリカバリンの役割

視細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は光刺激の強度によって変化し、背景光の強さに応じて、ある一定の値を示す。暗順応状態では $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が高く、光刺激によってロドプシンからメタII中間体( $\text{Rh}^*$ )が生成すると、ロドプシキナーゼ(RK)による $\text{Rh}^*$ のリン酸化反応がリカバリン( $\text{Rec}$ :  $\text{Ca}^{2+}$ 結合型)によって抑制されている。そのため、 $\text{Rh}^*$ の活性化状態が持続し、トランスデューシン( $\text{Gt}$ )を介したcGMPカスケードの寿命が延びる。つまり、光信号が効率良く伝達され、視細胞の光感受性は高い。ところが明順応状態では、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が低く抑えられており、リカバリン( $\text{Ca}^{2+}$ 遊離型)による抑制が解除されているため、 $\text{Rh}^*$ のリン酸化反応が速やかに起こり、光感受性は低下する。リカバリンはN末端が脂肪酸により修飾されており、この脂肪酸を介して $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的に外節膜と結合する(図4参照)。

#### 【1-4】リカバリンのN末端脂肪酸修飾

リカバリンの機能を考えるうえで興味深いのは、そのN末端グリシン残基に脂肪酸が共有結合していることである(Dizhoor *et al.*, 1992)。蛋白質のN末端の修飾脂肪酸としてはミリスチン酸(C14:0)がよく知られているが、当研究室では視細胞のT $\alpha$ が4種類の脂肪酸(C14:0、C14:1、C14:2およびC12:0)のうちのいずれか1つの脂肪酸によって修飾されていることを見出した(Kokame *et al.*, 1992)。ほぼ同じ時期に、T $\alpha$ と同様の不均一な脂肪酸修飾がリカバリンにおいても検出された(図3)。このような不均一な脂肪酸修飾は極めて珍しく、現在では視細胞の蛋白質においてのみ見出されている(Johnson *et al.*, 1994)。

これまで、T $\alpha$ の4種類の脂肪酸構造の役割については、当研究室において以下のような研究成果を報告した。まず、T $\alpha$ のN末端部分に相当する9アミノ酸残基からなるアシル化ペプチドを合成し、このペプチドがT $\alpha$ -T $\beta$ γ間の相互作用を拮抗的に阻害することを見出した(Kokame *et al.*, 1992)。ここで、T $\alpha$ -T $\beta$ γ間の相互作用を阻害するアシル化ペプチドの濃度を比較すると、4種類の脂肪酸構造の間に顕著な違いが見られ、C14:0 >> C14:1 > C14:2 = C12:0という順に阻害効果が低下した(Kokame *et al.*, 1992; Shouno *et al.*, 1996)。つまりT $\alpha$ は、N末端の脂肪酸を介してT $\beta$ γと相互作用しており、脂肪酸構造の異なる4種類のT $\alpha$ は、それぞれT $\beta$ γとの親和性が異なるということが示唆された。

一方、リカバリンのN末端脂肪酸の役割として注目すべきことは、N末端脂肪酸がCa<sup>2+</sup>濃度依存的な分子内スイッチとして機能する点である。つまり、Ca<sup>2+</sup>が結合していないリカバリンのN末端脂肪酸は、分子内の疎水的領域に格納されており(Tanaka *et al.*, 1995)、Ca<sup>2+</sup>が結合すると、脂肪酸は蛋白質外部に露出する(Ames *et al.*, 1995b; Hughes *et al.*, 1995)ということが、NMRによる構造解析によって明らかにされた。また、ミリスチル化されたリカバリンと未修飾のリカバリンの膜結合能を調べると、ミリスチル化リカバリンはCa<sup>2+</sup>濃度の上昇に伴って細胞膜と結合するのに対して、未修飾のリカバリンは細胞膜と結合できない(Zozulya & Stryer, 1992; Dizhoor *et al.*, 1993)。このことから、Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇に伴って蛋白質外部に露出したN末端脂肪酸は、Ca<sup>2+</sup>結合型リカバリンを細胞膜につなぎとめる膜アンカーとして働くと考えられている(図4)。しかしながら、不均一なN末端脂肪酸がリカバリンの機能をどのように調節しているのか、また上述したCa<sup>2+</sup>濃度依存的な膜結合がリカバリンの機能にどのような影響を及ぼすのかは明らかになっていない。

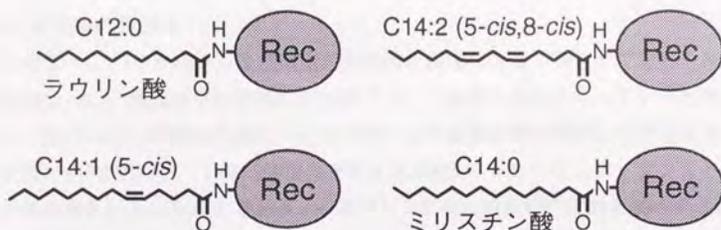


図3 リカバリンのN末端脂肪酸の構造

Rec: リカバリン

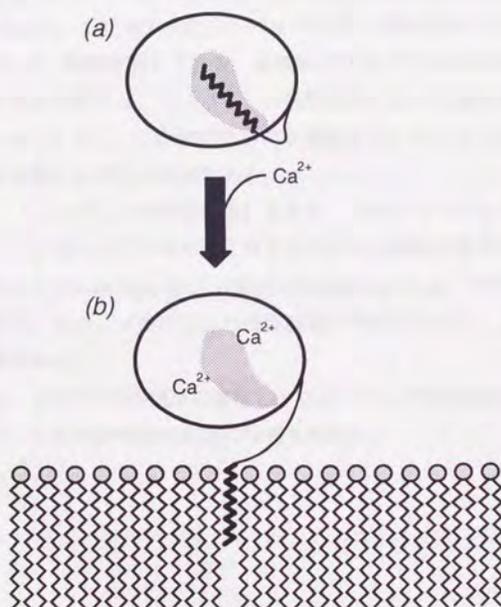


図4  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性なリカバリンの脂質膜との結合モデル

(Dizhoor *et al.* [1993]のFig.5を参考にした。)

網かけの部分はリカバリンの疎水的領域を表し、太いジグザグの線はN末端脂肪酸を表す。

(a)  $\text{Ca}^{2+}$ が結合していないリカバリンは、N末端脂肪酸を分子内の疎水的領域に格納している。

(b) リカバリンに $\text{Ca}^{2+}$ が結合すると構造変化を起こし、N末端脂肪酸が外部に露出する。このN末端脂肪酸を介して脂質二分子膜と相互作用する。

### 【1-5】未解決の問題点

以上のように、リカバリンは視細胞の光感度の調節に大きく寄与しており、N末端の修飾脂肪酸は、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的な機能制御因子として重要な役割を担っていると推定できる。しかし、リカバリンの機能発現における不均一な脂肪酸修飾の役割には不明な点が多い。

まず第一の問題点は、「脂肪酸構造が異なる4種類のリカバリンアイソフォームの機能は異なるのか?」ということである。リカバリンのN末端修飾の役割を調べたこれまでの研究は、ミリスチル化されたリカバリンと未修飾のリカバリンの機能を比較解析したものである(Kawamura *et al.*, 1994; Calvert *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995)。しかしこの方法では、視細胞に特徴的な不均一な脂肪酸構造の役割を評価することができない。

第二の問題点は、「リカバリンの $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的な膜結合の役割」である。ミリスチル化リカバリンと未修飾のリカバリンの比較解析からは、互いに相反する結果が報告されている。つまり、ロドプシンのリン酸化反応を抑制する活性には両者の間に差がない(Calvert *et al.*, 1995)という報告と、ミリスチル化リカバリンの方が抑制効果が強い(Chen *et al.*, 1995)という報告があり、議論が別れている。未修飾のリカバリンは細胞膜と結合しないので、上述の相反する実験結果から、リカバリンの機能発現における膜結合の重要性についても意見が別れている。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的な膜結合がリカバリンの機能にどのような影響を及ぼすのかを調べた報告は皆無である。

第三の問題点は、「リカバリンの作用機構」である。リカバリンがロドプシンのリン酸化反応を抑制することは知られているが、これまでの研究は細胞の懸濁液といったcrudeな系を用いて行われており(Kawamura *et al.*, 1992b; Kawamura *et al.*, 1993)、標的蛋白質の同定には至っていない。また、リカバリンの作用機構を解明するには、上記の2つの問題点を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、上記3つの問題点に着目し、リカバリンの作用機構とリカバリンの機能発現における不均一な脂肪酸修飾の役割の解明を試みた。

## 2. 材料と方法

### 【2-1】緩衝液

本研究で使用した緩衝液の組成を以下に示す。

#### ROS Buffer

10mM MOPS-NaOH (pH 7.5 at 4°C), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 30mM NaCl, 60mM KCl,  
1mM DTT, 4μg/ml leupeptin, 4μg/ml aprotinin

#### Rv抽出Buffer

10mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4°C), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM EGTA, 1mM DTT,  
4μg/ml leupeptin, 4μg/ml aprotinin, 40μg/ml benzamidine

#### Buffer F1

10mM Tris-HCl (pH 7.7 at 20°C), 3mM MgCl<sub>2</sub>

#### RK抽出Buffer

20mM Tris-HCl (pH 8.3 at 4°C), 240mM KCl, 1mM EDTA, 40μg/ml benzamidine

#### RK透析Buffer

10mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4°C), 0.4%(v/v) Tween 80, 1mM DTT,  
4μg/ml leupeptin, 4μg/ml aprotinin, 40μg/ml benzamidine

#### Buffer F2

20mM Tris-HCl (pH 7.7 at 20°C), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02%(v/v) Tween 80,  
1mM DTT, 4μg/ml leupeptin, 4μg/ml aprotinin, 40μg/ml benzamidine

#### Rv透析Buffer

10mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4°C), 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EGTA, 1mM DTT

#### Buffer R

10mM Tris-HCl (pH 7.9 at 20°C), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 4μg/ml leupeptin,  
4μg/ml aprotinin, 40μg/ml benzamidine

#### V8 Buffer

100mM Tris-HCl (pH 8.0 at 20°C), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>

#### Buffer L

50mM Tris-HCl (pH 7.5 at 4°C), 5mM EDTA, 0.5μg/ml PMSF, 2.5μg/ml pepstatin,  
100μg/ml benzamidine

#### Buffer G

10mM Tris-HCl (pH 7.4 at 4°C), 100mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5μg/ml PMSF,  
5.0μg/ml pepstatin, 100μg/ml benzamidine

#### Buffer A1

10mM Tris-HCl (pH 7.4 at 4°C), 100mM NaCl, 5mM EDTA, 0.05%(w/v) digitonin

#### Buffer A2

10mM Tris-HCl (pH 7.4 at 4°C), 1M NaCl, 5mM EDTA, 0.1%(w/v) digitonin

#### Buffer D

10mM Tris-HCl (pH 7.4 at 4°C), 0.05%(w/v) digitonin

#### HEN Buffer

10mM Hepes-NaOH (pH 8.0 at 20°C), 1mM EDTA, 160mM NaCl

## 【2-2】 視細胞外節膜の調製

視細胞外節膜の調製は、Fukada *et al.* (1994)の方法に従った。

新鮮なウシ眼球は、芝浦臓器株式会社(東京)において購入し、黒いビニール袋に入れて遮光・氷冷した状態で研究室に持ち帰った。以下の操作は、赤く塗装した40 Wタングステンランプ(セラミックカラーランプ; 東輝電気工業、以後単に赤ランプと呼ぶ)の赤色光のもと、暗室で行った。ウシ眼球の赤道面を解剖ハサミで切開し、網膜の付着する後半球(眼杯)の周囲に3~4ヶ所の切れ目をいれて眼杯を裏返した。硝子体を除去した後、ハサミの背の部分を用いて、網膜を周囲から盲点部分に向かって丁寧に集め、逆さにした。網膜は盲点で眼杯についたままぶら下がるので、盲点の部分をはさみで切り、遠心管(容量80 ml)に集めた。ここにROS Bufferを20~30 ml加えて遠心(HITACHI CR26H, 22,000xg, 10 min)した。遠心後、上清を除去し、沈澱は遠心管ごとアルミホイルで遮光して-80 °Cで保存した。

-80 °Cで保存しておいたウシ網膜(200-300枚分)を素早く解凍し、40 % (w/v) ショ糖を含むROS Buffer (200 ml)で懸濁した。この懸濁液を蓋付き遠心管(容量500 ml)に集めた後、手で1分間激しく振盪した。この操作により視細胞外節部分は網膜から脱離する。この懸濁液を遠心(HITACHI CR26H, 18,000xg, 20 min)し、浮遊する外節を上清と共に集めた。得られた沈澱に対し、もう一度同じ操作を繰り返し、1回目の上清と合わせた。これら2回分の外節膜画分に同容量のROS Bufferを加えてショ糖濃度を20 %に下げ、遠心(HITACHI CR26H, 18,000xg, 40 min)した。この遠心操作で外節膜は沈澱として回収される。遠心後、上清を除去し、沈澱に約40 mlのROS Bufferを加えて懸濁した。ここまでの操作と並行して、6本の遠心管(容量35 ml)にショ糖の不連続密度勾配(下層: 36 % (w/v) ショ糖溶液12 ml、上層: 29 % (w/v) ショ糖溶液10 ml)を作成しておく。ここに上記の懸濁液を6等分して重層し、スイング型ローター(SW28)を用いて遠心(Beckman L-60, 113,000xg, 60 min)した。この操作により、視細胞外節膜は29 %と36 % (w/v) ショ糖溶液の境界に浮遊する。この外節膜画分をコマゴメベットを用いて回収し、視細胞外節膜画分として用いた。

## 【2-3】 リカバリンの精製

以下の操作では、ロドプシンキナーゼの部分精製も同時に行っている。

ウシ視細胞外節膜は、【2-2】で記した方法に光条件に関する変更を加えた条件下で単離した。つまり、視細胞外節膜画分を20 % ショ糖溶液中で懸濁した後の操作は全て蛍光灯下で行った。蛍光灯下で行うことによりロドプシンが光を吸収してメタII中間体に変化し、ここへロドプシンキナーゼが結合するので、ロドプシンキナーゼを水溶性画分(上清)に逃がすことなく膜画分に回収できる(Sitaramayya, 1986)。このようにして得られた視細胞外節膜(網膜200-300枚分から単離)に、2 mM EGTAを含むRv抽出Buffer(100 ml)を加えて、テフロンホモゲナイザーを用いてホモゲナイズ(10ストローク)した。この懸濁液を遠心管に集め、

遠心(Beckman L-60, 105,000 $\times$ g, 30 min)した。リカバリンはCa<sup>2+</sup>濃度が高いときは外節膜と結合し、Ca<sup>2+</sup>濃度を低下させると外節膜から遊離して水溶性画分に移行する(Zozulya & Stryer, 1992; Dizhoor *et al.*, 1993)ので、上記の遠心操作によりリカバリンは上清から回収される。そこで上清を回収した後、得られた沈澱に対して同様の操作(Rv抽出Bufferで懸濁、遠心および上清回収)をさらに2回繰り返した。その後三分の抽出液を全て併せて、次のPhenyl Sepharoseカラムクロマトグラフィーに供した。一方、遠心操作で最終的に得られた沈澱はロドプシンキナーゼを含んでいるので、遠心管ごとアルミホイルで遮光して-80°Cで保存し、ロドプシンキナーゼを精製する出発材料として用いた。

#### Phenyl Sepharoseカラムクロマトグラフィー

Phenyl Sepharose CL-4B (Pharmacia)は、Sepharoseにフェニル基を結合させた疎水性カラム担体である。Ca<sup>2+</sup>結合蛋白質の多くは、Ca<sup>2+</sup>が結合すると蛋白質表面に疎水の領域(おそらく標的蛋白質との相互作用部位)が露出し、Phenyl基のような疎水基と強く結合することが知られている。ウシ視細胞のリカバリンも同様の性質を示す(Polans *et al.*, 1991; Kawamura *et al.*, 1992a)ので、リカバリンのCa<sup>2+</sup>の結合に伴うPhenyl Sepharoseカラムへの吸着ならびにCa<sup>2+</sup>の除去に伴うカラム担体からの遊離という性質を利用してリカバリンを精製した。

Rv抽出Bufferに終濃度で3.5 mMとなるようにCaCl<sub>2</sub>を加え、pHを8.0に合わせた(この緩衝液を以下、high-Ca Bufferと呼ぶ)。Rv抽出Bufferには2 mMのEGTAが含まれているので、high-Ca Bufferの遊離Ca<sup>2+</sup>濃度は約1.5 mMとなる。まずPhenyl Sepharoseカラム(10 mmID x 70 mm)をhigh-Ca Bufferで平衡化(30 ml/hr)した。一方、外節膜から抽出したリカバリンを含む溶液のCa<sup>2+</sup>濃度は低いので、終濃度で3.5 mMとなるようにCaCl<sub>2</sub>を加えてpHを8.0に合わせた。この操作において、CaCl<sub>2</sub>を加えるとEGTAよりプロトンが放出されて溶液のpHが低下するので、急激にpHが低下しないようにCaCl<sub>2</sub>を少量ずつ加え、その都度pHを合わせた。この試料をPhenyl Sepharoseカラムにロード(30 ml/hr)し、high-Ca Bufferで洗浄(30 ml/hr)した。その後、Rv抽出Bufferを用いて、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。この際、溶出液の280 nmにおける吸光度を経時的に記録しながら回収した。この一連の操作により、Ca<sup>2+</sup>濃度が高いときにPhenyl Sepharoseに吸着し、Ca<sup>2+</sup>濃度が低くなるとPhenyl Sepharoseから遊離する蛋白質(大部分はCa<sup>2+</sup>結合蛋白質)が回収される。この溶出液は、次のMonoQカラムクロマトグラフィーに供した。

#### MonoQカラムクロマトグラフィー

Phenyl Sepharoseカラムから溶出したリカバリン画分を更に精製することを目的として、MonoQカラムクロマトグラフィーを行った。この操作は、室温にてFPLCシステム(Pharmacia)を用いて行った。まずMonoQ HR5/5カラム(5mmID x 50 mm; Pharmacia)をBuffer F1で平衡化(2 ml/min)した後、Phenyl Sepharoseカラムからの溶出液(リカバリン画

分)をカラムに添加(2 ml/min)した。添加終了後、カラムをBuffer F1で洗浄(2 ml/min)した。溶出液には溶媒A(Buffer F1)と溶媒B(1 MのNaClを含むBuffer F1)を用い、A:Bの比率を100:0から50:50まで2.5 %/minで上昇させて、カラムに吸着した蛋白質を溶出した(2 ml/min)。この際、溶出液は280 nmにおける吸光度を経時的に記録しながら数フラクションに分けて回収した。各フラクションをSDS-PAGEで分析した結果、リカバリンは約90 mMから140 mMというNaClの濃度範囲で溶出していることが確認された。リカバリンとして純度の高いフラクションを選び、-80 °Cで保存した。

#### 【2-4】 N末端脂肪酸構造の異なるリカバリンの分離・精製

リカバリンのN末端グリシン残基には、4種類の脂肪酸がアミド結合している(図3)。この脂肪酸の違いによってリカバリンの機能がどのように変化するか調べるために、リカバリンのN末端構造が互いに異なる4種類のリカバリンを分離精製することを試みた。まず【2-3】に記したようにPhenyl Sepharoseカラムを用いてリカバリンの精製を行い、カラムからの溶出液を逆相HPLCに供した。カラムは、Cosmosil 5C<sub>18</sub>-P-300 (Nakalai Tesque)を用いた。まずカラムを溶媒A (0.1 % TFAを含むH<sub>2</sub>O)で平衡化(1 ml/min)した後、試料を添加した。添加終了後、溶媒Aと溶媒B (0.1 % TFAを含むアセトニトリル)の混合比率を直線的に変化させる濃度勾配で溶出した(溶媒A:溶媒Bの混合比は、90:10(0分)→60:40(5分)→30:70(35分); 流速1 ml/min)。この時、リカバリンは3つのピークを形成して溶出した。これらのピークをそれぞれ分取し、SpeedVac concentrator (SVC100H, Savant)を用いた遠心乾燥によって濃縮した。溶媒にはアセトニトリル及びTFAが含まれるが、これらは水よりも気化しやすく、遠心乾燥の操作で大部分が除去されと考えられる。遠心乾燥の際には、試料が凍結しないよう注意した。さらに、濃縮した試料(約1 ml)から完全にアセトニトリルとTFAを除去するために透析を行った。500 mlのRv透析Bufferに対して3回、各6時間以上透析した。このようにして得られた三成分のリカバリンは、-80 °Cで保存した。

#### 【2-5】 ロドプシンキナーゼの精製

視細胞外節からのロドプシンキナーゼの抽出ならびに精製は、Sitaramayya (1986), Kelleher & Johnson (1990) およびPalczewski *et al.* (1992a)の方法に改良を加えて行った。

外節膜からリカバリンを抽出する操作(【2-2】参照)において、ロドプシンキナーゼはメタII中間体に結合しているので、最終的に得られた膜画分(沈澱)はロドプシンキナーゼを含んでいる。この膜画分を高張緩衝液(240 mMのKClを含むRK抽出Buffer)に懸濁すると、ロドプシンキナーゼはメタII中間体から遊離して水溶性画分へ移行する(Sitaramayya, 1986; Kelleher & Johnson, 1990)。この性質を利用して以下の操作によりロドプシンキナーゼを精製した。

リカバリン抽出後の膜画分(網膜200-300枚分に相当)に100 mlのRK抽出Bufferを加えて、テフロンホモゲナイザーを用いてホモゲナイズ(10ストローク)した。この懸濁液を暗箱に入れて遮光した状態で、一昼夜攪拌した(4°C)。その後、赤色光(> 670 nm)の下で懸濁液を遠心管に集め、遠心(Beckman L-60, 105,000xg, 30 min)した。遠心終了後、上清を回収して500 mlのRK透析Bufferに対して5時間以上、計2回透析した。ロドプシンキナーゼは、自己リン酸化する蛋白質であり(Kelleher & Johnson, 1990)、上記の抽出液には、リン酸化型ロドプシンキナーゼと非リン酸化型ロドプシンキナーゼが混在している。抽出および透析の操作の間に、混在する脱リン酸化酵素によって大部分のロドプシンキナーゼは非リン酸化型となるが(Palczewski *et al.*, 1992a)、ロドプシンキナーゼを確実に非リン酸化型に変化させるために透析時間を長くした。透析終了後、試料を回収してHeparin Sepharoseカラムクロマトグラフィーに供した。

#### Heparin Sepharoseカラムクロマトグラフィー

Heparin Sepharose CL-6B (Pharmacia)は、糖の一種であるヘパリンがSepharoseに結合したアフィニティー担体である。ロドプシンキナーゼは、Heparin Sepharoseに吸着し、自己リン酸化型ロドプシンキナーゼは約100 mMの塩濃度でカラムから溶出する。一方、非リン酸化型ロドプシンキナーゼは約200 mMの塩濃度でカラムから溶出する(Buczylko *et al.*, 1991)。この溶出時の塩濃度の違いを利用してロドプシンキナーゼを以下のように精製した。

まずHeparin Sepharoseカラム(10 mmID x 100 mm)をRK透析Bufferで平衡化(20 ml/hr)した後、上記のロドプシンキナーゼ粗画分をHeparin Sepharoseカラムに添加(20 ml/hr)した。添加終了後、RK透析Bufferで洗浄(20 ml/hr)し、引き続き125 mMのKClを含むRK透析Bufferを用いて洗浄(20 ml/hr)した。その後さらに、100 mMのKClを含むRK透析Bufferによってカラムを洗浄(20 ml/hr)した。洗浄終了後、100 mMのKClと0.2 mMのATPを含むRK透析Bufferを添加(12 ml/hr)し、カラム内でロドプシンキナーゼを自己リン酸化させた。このイオン強度(100 mM KCl)では、自己リン酸化型ロドプシンキナーゼはカラム担体から遊離してくるので、溶出液を2 mlずつ分取し、合計28 ml(14フラクション)の溶出液を回収した。各フラクションに含まれるロドプシンキナーゼ活性を測定し、ロドプシンキナーゼを含むフラクションを次のMonoQカラムクロマトグラフィーに供した。

#### MonoQカラムクロマトグラフィー

Heparin Sepharoseカラムから溶出したロドプシンキナーゼをさらに精製し、これと同時に、共存するATPを除去することを目的として、MonoQカラムクロマトグラフィーを行った。まずMonoQ HR5/5カラムをBuffer F2で平衡化(2 ml/min)した。Heparin Sepharoseカラムから溶出したロドプシンキナーゼ画分に、その2倍容量のBuffer F2を加えて試料の塩濃度を下げ、MonoQカラムに添加した。添加終了後、Buffer F2でカラムを洗浄した。溶出液には溶媒A(Buffer F2)と溶媒B(1 MのKClを含むBuffer F2)を用い、A:Bの比率を100:0から

50:50まで2.5%/minで上昇させて、カラムに吸着した蛋白質を溶出(2 ml/min)した。溶出液は2 mlずつ分取し、各フラクションに含まれるロドプシンキナーゼ活性を測定した。活性測定後、ロドプシンキナーゼを含むフラクションは4℃で保存した。

#### [2-6] Urea-washed ROSの調製

尿素を含む緩衝液で視細胞外節膜を懸濁することにより、ロドプシンキナーゼなどの水溶性蛋白質と膜表面性蛋白質を完全に除去することができる。そこで受容体キナーゼの活性を測定する際の基質(ロドプシンを含む膜画分)として、以下のようにして調製したUrea-washed ROSを用いた。なお以下の操作は全て赤色光(> 670 nm)の下で行った。

視細胞外節膜(網膜100枚分に相当)を赤色光の下で調製し、5 M尿素を含むBuffer R(70 ml)に懸濁した。この懸濁液をホモゲナイズ(3ストローク)して室温で15分間静置した後、懸濁液に同容量の氷冷したBuffer Rを加えて、直ちに遠心(Beckman L-60, 142,000xg, 30 min)した。遠心後、上清を除去し、得られた沈殿に50 mlのBuffer Rを加え、ホモゲナイズ(3ストローク)した。さらに、この懸濁液を遠心し、再び上清を除去した。この一連の操作(Buffer Rに懸濁、遠心および上清除去)を合計4回行った。このBuffer Rによる洗浄によって懸濁液に含まれる尿素は完全に除去できる。最終的に得られた沈殿に8 mlのBuffer Rを加えてホモゲナイズ(10ストローク)し、その膜標品のロドプシン濃度を分光学的に定量した後、アルミホイルで遮光して-80℃で保存した。これら一連の操作によって100~200 $\mu$ Mのロドプシンを含むUrea-washed ROSが調製できた。

#### [2-7] $\beta$ アドレナリン受容体の調製

$\beta$ アドレナリン受容体の精製(Benovic, 1990; Kameyama *et al.*, 1993)は、東京大学医学部脳研究施設 芳賀達也教授ならびに芳賀和子先生の御指導のもとに行った。また、以下の操作は特に断らない限り、4℃で行った。

#### [2-7-1] ウシ肺の膜画分の調製

ウシ肺は、芝浦臓器株式会社(東京)において購入し、氷冷した状態で研究室に持ち帰った。ウシ肺(約3.8 kg)から太い血管や表層の脂肪組織などを切除し、5~10 cmの大きさに細切した。この肉断片をひき肉機によりミンチ状にし、4 LのBuffer Lに懸濁してワーリングブレンダー(Waring社)により細切処理した(10 sec x 3回)。得られた懸濁液をポリトロン型ホモジナイザー(ヒスコトロン; 日音医理化器械製作所)により最高速(30,000 rpm)で攪拌・破碎(30 sec x 3回)した後、遠心(TOMY XRX-200, 200xg, 10 min)して上清を回収した。得られた沈殿を再び4 LのBuffer Lに懸濁して同じ操作を繰り返し、1回目の上清と併せた。これら2回分の上清を2層のガーゼで濾過した後、得られた濾液を遠心(HITACHI SCP70H,

188,000xg, 15 min)した。遠心後、沈殿をBuffer L (約800 ml)に懸濁し、ポリトロン型ホモジナイザーにより攪拌・破碎 (20 sec)した。この懸濁液を遠心 (HITACHI SCP70H, 188,000xg, 45 min)した後、上清を除去した。得られた沈殿を再度、Buffer L (約500 ml)に懸濁し、ポリトロン型ホモジナイザーによる破碎処理 (20 sec)を行った後、この懸濁液はウシ肺膜画分として-80 °Cで保存した。これら一連の操作により約8000 pmolのβアドレナリン受容体を含む膜画分(500 ml)が得られた。

#### [2-7-2] βアドレナリン受容体の精製

-80 °Cで保存しておいたウシ肺膜画分(5000 pmolのβアドレナリン受容体を含む画分)を、4 °Cで解凍し、低濃度(0.3 %)のジキトニンを含むBuffer G (1.5 L)に懸濁した。この懸濁液を30分間攪拌した後、遠心 (HITACHI SCP70H, 106,000xg, 20 min)した。遠心後、上清を除去して沈殿を回収した。この操作では、βアドレナリン受容体は可溶化されず、大部分の膜表面性蛋白質を上清として除去できる。このようにして得られた沈殿に1 % (w/v)のジキトニンおよび0.13 % (w/v)のコール酸ナトリウムを含むBuffer G (1.5 L; この緩衝液を以下、high-digotonin bufferと呼ぶ)を加え、ポリトロン型ホモジナイザーで懸濁した後、スターラーを用いて攪拌した(60 min)。この懸濁液を遠心(HITACHI SCP70H, 188,000xg, 45 min)し、可溶化されたβアドレナリン受容体を含む水溶性画分を回収した。この可溶化画分は引き続き、Sephacel-alprenololアフィニティカラムクロマトグラフィーに供した。

#### Sephacel-alprenololアフィニティカラムクロマトグラフィー

βアドレナリン受容体はアンタゴニストであるalprenololと特異的に結合するので、Sephacel 4B (Pharmacia)にalprenololを共有結合させたアフィニティカラム(Sephacel-alprenololカラム)によりβアドレナリン受容体を選択的に単離することができる(Benovic, 1990)。なお、Sephacel-alprenololアフィニティ担体は東京大学医学部脳研究施設の芳賀和子先生に作製して頂いた。

まず、Sephacel-alprenololカラム(44 mmID x 330 mm)をhigh-digotonin bufferで平衡化(60 ml/h)した後、上記の可溶化画分の全量を添加(60 ml/h)した。添加終了後、Buffer A1 (約120 ml)、引き続きBuffer A2(約800 ml)でカラムを洗浄した。その後再び、Buffer A1 (約500 ml)によってカラムを十分に洗浄した(60 ml/h)。洗浄終了後、このカラムの溶出口側にPhenyl Sepharoseカラム(14 mmID x 65 mm; Pharmacia)を連結し、100 μMのalprenololを含むBuffer A1を添加した(40 ml/h)。この操作により、Sephacel-alprenololカラムに吸着していたβアドレナリン受容体は担体から遊離し、連結したPhenyl Sepharoseカラムに吸着する。そこで次に、この連結カラムを分離してから、Phenyl Sepharoseカラムを0.01 % (w/v)のdigitoninを含む10 mM Tris buffer (pH 7.4 at 4°C)で洗浄した。洗浄後、このカラムの溶出口側に、今度はDEAE Sephacelカラム(7.5 mmID x 30 mm; Pharmacia)を連結し、1.0 %

(w/v) digitoninおよび1  $\mu$ M alprenololを含む10 mM Tris buffer (pH 7.4 at 4°C)で溶出(40 ml/h)した。この操作により、Phenyl Sepharoseカラムに吸着していた $\beta$ アドレナリン受容体は遊離し、連結したDEAE Sephacelカラムに吸着する。そこで、この連結カラムを分離してから、DEAE SephacelカラムをBuffer Dで洗浄した(自然流速)。洗浄後、0.5 MのNaClを含むBuffer Dを用いて溶出した(自然流速)。溶出液は200  $\mu$ lずつ分取し、各フラクションに含まれる $\beta$ アドレナリン受容体濃度を定量した後、 $\beta$ アドレナリン受容体を含むフラクションは-80°Cで保存した。これら一連の操作によって、5000 pmolの $\beta$ アドレナリン受容体を含む膜画分から約800 pmolの $\beta$ アドレナリン受容体を単離することができた。

#### $\beta$ アドレナリン受容体のリン脂質膜への再構成

精製した $\beta$ アドレナリン受容体は、リン脂質膜 (phosphatidylcholine : phosphatidylinositol : cholesteryl hemisuccinate = 2 : 2 : 1)に以下のようにして再構成した。まず、DEAE Sephacelカラムから溶出した $\beta$ アドレナリン受容体 (45 pmol)を含む画分を、BSA (終濃度0.5 mg/ml)、(-) isoproterenol (終濃度0.1 mM)、sodium deoxycholate(終濃度0.09 % (w/v))、sodium cholate(終濃度0.02 % (w/v))および0.3 mgのリン脂質を含むHEN bufferと混合した(最終液量200  $\mu$ l)。さらに、Sephadex G50 Fineカラム(7.5 mmID x 45 mm; Pharmacia)をHEN bufferで平衡化した後、上記の懸濁液の全量をカラムに添加した。添加終了後、HEN bufferを用いて溶出し、void volumeから400  $\mu$ l ( $\beta$ アドレナリン受容体を含む画分)を回収した。この操作により、 $\beta$ アドレナリン受容体はリン脂質膜に再構成される。

#### **[2-8] 受容体キナーゼによる受容体のリン酸化反応**

以下の操作は、特に断らないかぎり4°Cで行った。まずプラスチックチューブにTween 80(終濃度0.002 % (v/v))を加えてvortexミキサーで攪拌し、チューブをTween 80でコートした。ここに、赤色光(> 670 nm)の下でUrea-washed ROS (ロドプシンとして終濃度20  $\mu$ M)を加えた後、各チューブを遮光した。その後、オレンジ色光 (> 540 nm)の下で遮光を外し、ロドプシンに光照射すると同時に、ここへロドプシンキナーゼおよび $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (終濃度0.2 mM)を加えて反応を開始した(反応液組成: 50 mM Tris-HCl, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5.04 mM EGTA, 0.02 % (v/v) Tween 80, 0.2 mM  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ; pH 7.9, 最終液量50  $\mu$ l)。反応液中の遊離 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は、Ca/EGTA Bufferにより設定した。反応液を25°Cで4分間インキュベートした後、100  $\mu$ lのSDS-PAGEサンプル溶液を添加して反応を停止し、そのうちの40  $\mu$ lをSDS-PAGEに供した。SDS-PAGE終了後、ゲルの染色・脱色を行い、つづいてゲルを完全に乾燥した。その後イメージアナライザー(FUJIX BAS MAC1000)を用いて、ロドプシンのバンドに含まれる放射活性( $^{32}\text{P}$ )を測定し、ロドプシンのリン酸化量を推定した。同様の方法により、 $\beta$ アドレナリン受容体キナーゼによるロドプシンのリン酸化量も推定した。

一方、ロドプシンキナーゼによる $\beta$ アドレナリン受容体のリン酸化反応は以下のようにし

て行った。ロドプシンキナーゼは自己リン酸化する蛋白質であり(Buczylko *et al.*, 1991)、自己リン酸化型ロドプシンキナーゼと $\beta$ アドレナリン受容体はSDS-PAGEにおいてよく似た易動度を示す。そこで、受容体のリン酸化反応中にロドプシンキナーゼが $^{32}\text{P}$ 標識されるのを最小限に抑える目的で、反応に先立って放射性同位元素で標識されていないATP(終濃度50 nM)とロドプシンキナーゼをインキュベート(25 °C, 120 min)してロドプシンキナーゼをまずリン酸化した。次いで、この自己リン酸化型ロドプシンキナーゼ(終濃度8 nM)を $\beta$ アドレナリン受容体(終濃度3.6 nM)と混合し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (終濃度5.0  $\mu\text{M}$ )を加えて反応を開始した(反応液組成: 50 mM Tris-HCl, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5.04 mM EGTA, 0.5 mg/ml ovalbumin, 0.001 % (v/v) Tween 80, 10  $\mu\text{M}$  (-)isoproterenol, 5.0  $\mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ; pH 7.9, 最終液量50  $\mu\text{l}$ )。反応液中の遊離 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は、Ca/EGTA Bufferにより設定した。反応液を25 °Cで30分間インキュベートした後、950  $\mu\text{l}$ の氷冷したEDTA溶液(20 mM Tris-HCl, 30 mM EDTA, 5 mM EGTA, 250 mM NaCl; pH 7.9)を添加してリン酸化反応を停止した。反応停止後、この反応液を遠心(Beckman Optima TL, 436,000xg, 60 min at 4 °C)し、反応中に $^{32}\text{P}$ 標識されたロドプシンキナーゼを含む上清を除去した。得られた沈殿には $^{32}\text{P}$ 標識されたリン酸化型 $\beta$ アドレナリン受容体が含まれているので、この沈殿をSDS-PAGEサンプル溶液で可溶化してSDS-PAGEに供した。SDS-PAGE終了後、ゲルの染色・脱色を行い、つづいてゲルを完全に乾燥した。その後イメージアナライザー(FUJIX BAS MAC1000)を用いて、 $\beta$ アドレナリン受容体のバンドに含まれる放射活性( $^{32}\text{P}$ )を測定した。

一方、 $\beta$ アドレナリン受容体キナーゼ(終濃度1.7 nM)による $\beta$ アドレナリン受容体のリン酸化反応は、上記の実験に若干の変更を加えて行った。つまり、反応の停止は、SDS-PAGEサンプル溶液を添加することにより行った。また、 $\beta$ アドレナリン受容体キナーゼと $\beta$ アドレナリン受容体はSDS-PAGEにおいて易動度が異なるので、上述した遠心操作(キナーゼと受容体の分離)は行わずに直接オートラジオグラフィーに供した。これらの点を除いて、他は全て上記の方法に従った。

## [2-9] Ca/EGTA Bufferの調製

反応液中の遊離 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を低く保つ場合には、EGTAを用いた金属緩衝液が一般的に用いられる。様々な反応液の条件において、その反応液中の遊離 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を目的の設定値に保つため、一定濃度のEGTAに対して加える $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を変化させた。この場合、EGTA溶液と $\text{CaCl}_2$ 溶液を反応液に添加すると、EGTAからプロトンが放出して反応液のpHは低下する。そこで、以下のような緩衝液を用いた(Tsien & Pozzan, 1989)。

### $\text{K}_2\text{CaEGTA}$ Buffer

超純水に $\text{CaCO}_3$ (終濃度50 mM)、KOH(終濃度90 mM)およびEGTA(終濃度50 mM)を加え、 $\text{CaCO}_3$ を完全に溶解するまで煮沸した。室温にもどした後、Tris(終濃度500 mM)を加えて

pHを7.9に調整した。

#### $K_2H_2EGTA$ Buffer

超純水にEGTA(終濃度50 mM)およびTris(終濃度500 mM)を加え、KOH溶液を用いてpHを7.9に調整した。

上記の2つの溶液はどのような比率で混合しても、混合液のpHは7.9に保持される。そこで、反応液中の遊離 $Ca^{2+}$ 濃度を調節する時には、EGTAと $Ca^{2+}$ が目的の濃度になるように上記の二つの緩衝液の混合比を変化させて反応液に加えた。反応液中の遊離 $Ca^{2+}$ 濃度の計算は、Caldwell (1970)およびMartell & Smith (1974)に従い、「Ca-EGTA緩衝液における遊離カルシウムイオン濃度を計算するプログラム」(洲崎敏伸, 1987)を用いて行った。

#### [2-10] 提供された試料

##### 三量体G蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニット

ブタ脳から三量体G蛋白質を単離し、さらにGi, GoおよびGsをそれぞれ分離した。その後、Gs画分から $\beta\gamma$ サブユニットを精製した(Haga & Haga, 1992)。

##### $\beta$ アドレナリン受容体キナーゼ

ウシ $\beta$ ARK1cDNAをSf9細胞で発現させた後、 $\beta$ アドレナリン受容体キナーゼを精製した(Kameyama *et al.*, 1993)。

以上の2つの蛋白質は芳賀達也教授(東京大学医学部脳研究施設)に参与して頂いた。

#### [2-11] その他の方法

##### [2-11-1] SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

蛋白質の電気泳動は基本的にLaemmli(1970)の方法に従い、13%アクリルアミドゲルを用いて行った。

##### [2-11-2] 蛋白質定量法

ロドプシンおよび $\beta$ アドレナリン受容体以外の蛋白質の定量は、BSAを標準蛋白質とし、Bradford (1976)の方法に従って行った。ロドプシン濃度は、吸収極大波長(498 nm)におけるロドプシンのモル吸光係数を40,600/M/cmとして、0.1 Mヒドロキシルアミン存在下にて光退色前後の差吸収スペクトルから求めた。

$\beta$ アドレナリン受容体の定量は、アンタゴニストであるdihydroalprenolol (DHA)と特異的に結合することを利用して、受容体標品への $[^3H]$ DHAの結合量から求めた(Benovic, 1990)。

### [2-11-3] 質量分析

質量分析は全て、大阪大学蛋白質研究所有機化学部門、下西康嗣教授ならびに高尾敏文助教授の御協力のもとに行った。

リカバリンのN末端ペプチドの質量分析は、質量分析計JMS-HX100 (Jeol)を用いたFAB質量スペクトルの測定によって行った。

### [2-11-4] リカバリンの蛍光測定

蛍光分析は、川戸佳教授(東京大学総合文化研究科広域科学専攻)の御好意で蛍光分光光度計F-3000 (HITACHI)を使用させて頂いて測定した。

### 3. 結果

〔N末端の不均一な脂肪酸構造がリカバリンの機能に及ぼす効果〕

#### [3-1] N末端の脂肪酸構造の異なるリカバリンの分離

リカバリンは、精製過程において用いたPhenyl SepharoseカラムおよびMonoQカラムからは単一のピークとして溶出される。しかしながら逆相カラムによって、リカバリンが3つのピークに分離することを見出した(図5)。3つのピークを分取してSDS-PAGEで分析したところ、いずれも26 kDaの単一バンド見られ、リカバリンのみを含んでいたため(図5 内挿図)、N末端構造の異なる4種類のリカバリンが三成分に分離したのではないかと考えた。そこで、これら三成分を、逆相カラムから溶出した順にp1-p3と名づけ、構造解析を以下のように進めた。なお、構造解析はN末端に焦点を絞った。リカバリンのN末端から数えて11残基目はグルタミン酸であり、V8プロテアーゼ(*Staphylococcus aureus* V8 protease)を用いてリカバリンを切断すると比較的短いN末端断片が得られると予想された。そこで、p1-p3に含まれるリカバリンをそれぞれV8プロテアーゼによって完全消化し、逆相HPLCによって消化断片を分離した。図6に示すように、ピークp1、p2およびp3それぞれの消化断片の分離パターンはほぼ相似形を示したが、図中でN1、N2およびN3と名付けたペプチドの溶出位置のみが異なることが判明した。これらのピークを回収し、エドマン分解に供したが耐性であったことから、いずれもN末端がブロックされたペプチドであると考えられた。つまりN1、N2、N3はいずれもリカバリンのN末端に由来するペプチド(GNSKSGALSKE)であることが強く示唆された。

そこでこれらの構造を明らかにするためにペプチドN1、N2およびN3のFAB質量スペクトルを測定した(Fukada *et al.*, 1990)。この測定においては、イオン化した試料を正イオンモードで検出している  $[(M+H)^+]$  ので、実際のペプチドの質量  $[M]$  は観測された値  $(m/z)$  より1マスユニット小さい。図7に示した質量スペクトルより、N1は質量1258.9と1282.9の2つのペプチドの混合物、N2は1284.8の質量を持つペプチド、N3は1286.9の質量をもつペプチドであると考えられた。ここで、N3の質量(1286.9)はリカバリンのN末端11残基(GNSKSGALSKE)にC14:0(ミリスチン酸)が結合していると仮定した場合の計算質量(1286.8)と一致する。一方、N2はN3に比べて質量が2だけ小さいことからアルキル鎖部分に二重結合を1つ持つ不飽和脂肪酸 C14:1が結合したものであると考えられた。またN1の一方の成分はN2よりさらに質量が2だけ小さいC14:2が結合したペプチド(計算質量 1282.7)であり、他方の成分はN3より質量が28小さいことからアルキル鎖部分の炭素数が二つ短い飽和脂肪酸C12:0(ラウリン酸)が結合したペプチド(計算質量 1258.7)であると考えられた。この一連の構造解析によって、N末端脂肪酸構造の異なる4種類のリカバリンは逆相HPLC

によって三成分にまで分離できたと結論した。つまりまとめると、p1はC14:2がN末端に結合したリカバリンとC12:0がN末端に結合したリカバリンの混合物、p2はC14:1がN末端に結合したリカバリン、さらにp3はC14:0がN末端に結合したリカバリンと結論できた(図8)。p1、p2およびp3のピーク面積値から判断すると、4種類のリカバリンアイソフォームの組成比は、29% (C14:2-/C12:0-リカバリンの和)、28% (C14:1-リカバリン)および43% (C14:0-リカバリン)と推定できた。



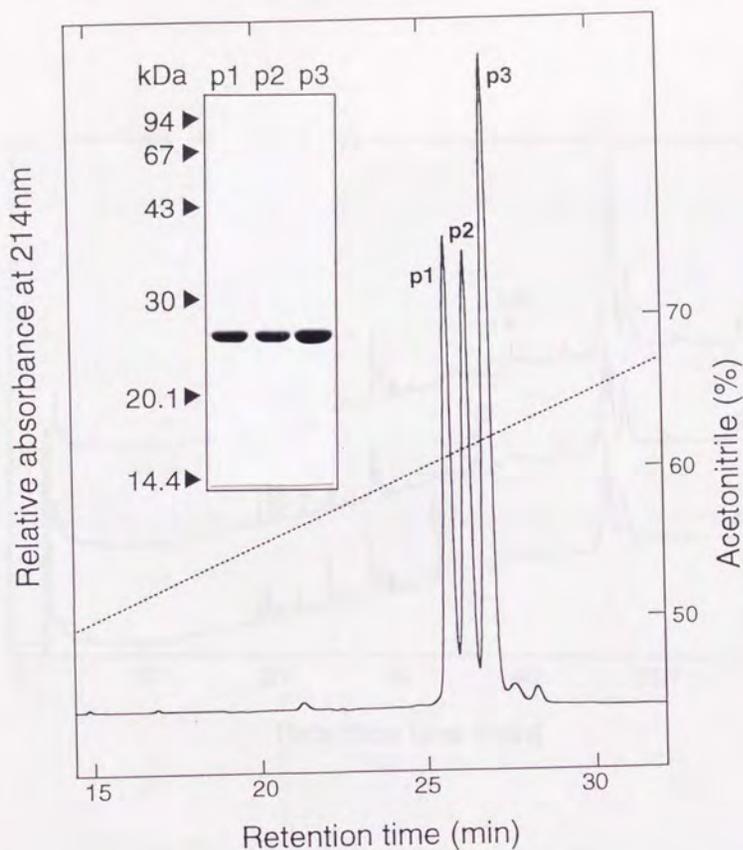


図5 逆相HPLCによるリカバリンの分離

リカバリンは視細胞外節からEGTAを用いて抽出し、さらにPhenyl SepharoseカラムおよびMonoQカラムを用いて精製した(方法の項【2-3】参照)。このリカバリンを逆相カラム(Cosmosil 5C<sub>18</sub>-P-300)に添加した後、0.05%TFAを含む超純水(溶媒A)と0.05%TFAを含むアセトニトリル(溶媒B)の混合比率を直線的に変化させる濃度勾配で溶出した(溶媒A:溶媒Bの混合比は、90:10(0分)→60:40(5分)→30:70(35分); 流速1 ml/min)。図に示した3つのピーク(p1、p2、p3)をそれぞれ分取し、SDS-PAGEに供した(内挿図)。

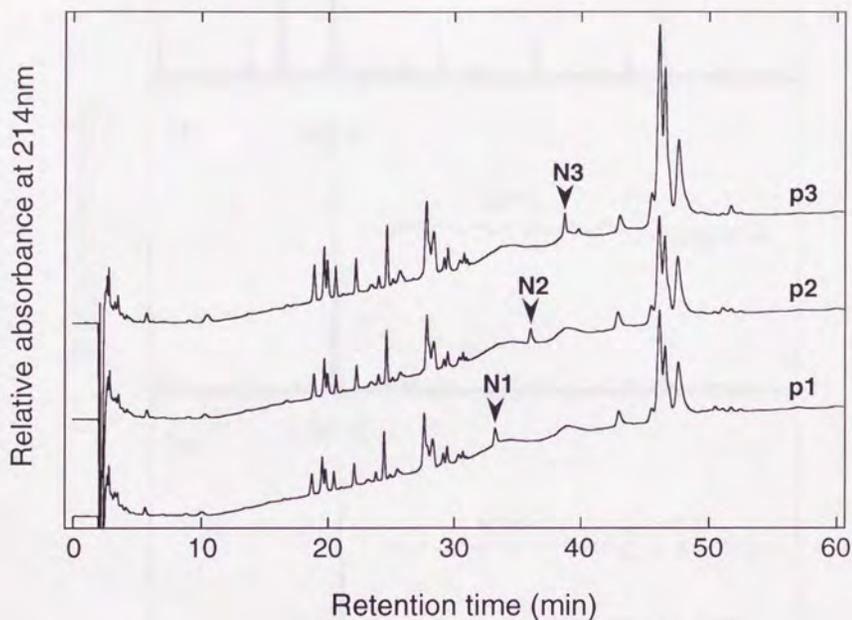


図6 三成分に分離したリカバリンのV8プロテアーゼによる消化断片の分離

60  $\mu\text{g}$ のリカバリンを逆相HPLCによって分離し(図5参照)、それぞれのピーク(p1、p2およびp3)を回収した。これらを凍結乾燥した後、V8 Buffer(23  $\mu\text{l}$ )に溶解し、それぞれに1.5  $\mu\text{g}$ のV8プロテアーゼ(2  $\mu\text{l}$ )を加えて30  $^{\circ}\text{C}$ で40分間インキュベートした。これらの消化断片をそれぞれ逆相カラム(Cosmosil 5C<sub>18</sub>-P-300)に添加した。溶出液には0.05 %TFAを含む超純水(溶媒A)と0.05 %TFAを含むアセトニトリル(溶媒B)を用いて、溶媒Bの濃度を10 %(0分)から70 %(60分)まで1 %/minで連続的に変化させて溶出した(流速: 1 ml/min)。

Relative intensity

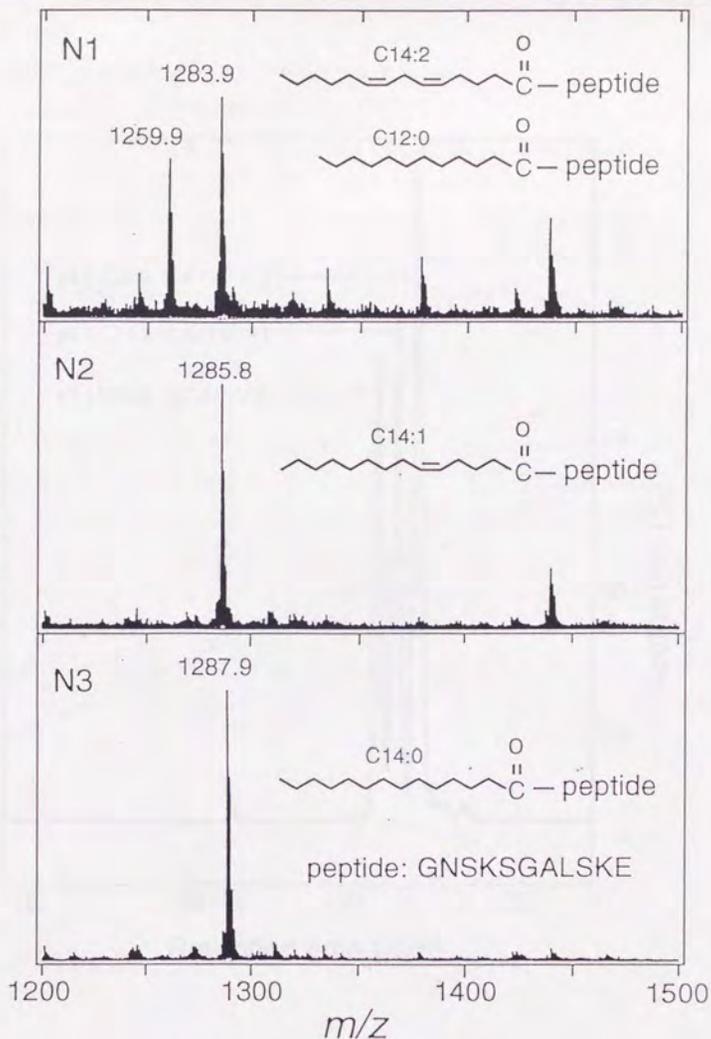


図7 リカバリンのN末端フラグメントのFAB質量スペクトル

逆相HPLC(図6)によって分離したN末端フラグメント(N1、N2およびN3)のFAB質量スペクトルを測定した。パネルは上から順にN1、N2およびN3の質量分析の結果である。測定されたN1、N2およびN3の $m/z$ 値は、各シグナルの上部に示した。これらの観測値から推定された構造は各パネルの内部に示した。

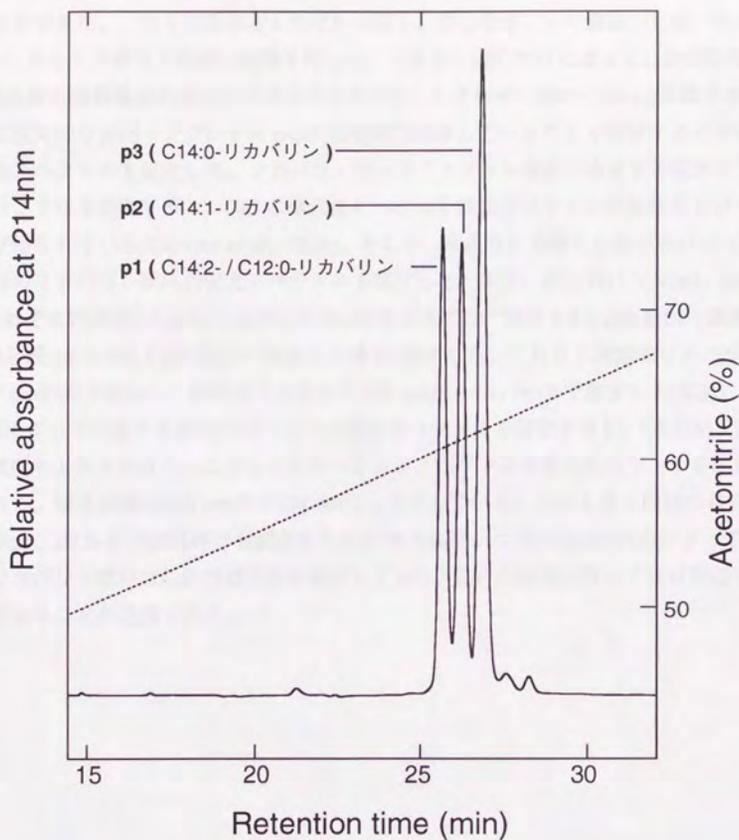


図8 逆相HPLCによって分離した三成分のリカバリンのN末端脂肪酸構造

詳細は図5参照。図7の結果より推定された三成分のリカバリン(p1、p2、p3)のN末端脂肪酸構造を各ピークと対応させて示した。

### [3-2] N末端脂肪酸の異なるリカバリンのCa<sup>2+</sup>結合能

[3-1] で示したように、N末端の修飾脂肪酸が異なるリカバリンを三成分にまで分離することができた。これら三成分をそれぞれ分取し、遠心乾燥により濃縮した後、Rv透析Bufferに対して透析して溶媒の交換を行った。これら一連の操作によって、250枚の網膜から、N末端の修飾構造の異なる三成分のリカバリンをそれぞれ200~250 µg単離できた。これら三成分のリカバリンがいずれもCa<sup>2+</sup>結合能を保持していることを確認するために、次に蛍光スペクトルを測定した。リカバリンのトリプトファン残基に由来する蛍光エミッションスペクトルを測定すると、Ca<sup>2+</sup>の結合にともなって蛍光スペクトルが長波長シフトすることが知られている(Dizhoor *et al.*, 1991)。そこで、三成分に分離した各リカバリン試料と分離前のリカバリン試料の蛍光スペクトルを測定した。まず、各リカバリン(p1、p2およびp3; それぞれ終濃度0.3 µM)にCa/EGTA Bufferを加えてCa<sup>2+</sup>濃度を8.0 µM(高Ca<sup>2+</sup>濃度: 図9ではHと略)または0.1 µM(低Ca<sup>2+</sup>濃度: Lと略)に設定した。これら三種類のリカバリン溶液を291 nmの光で励起し、試料からの蛍光を300 nmから450 nmまで測定した(図9)。逆相HPLCによって分離する前のリカバリンの蛍光スペクトルを測定すると(パネルA)、遊離Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させることによってエミッションスペクトルが長波長シフトする現象が観察された。極大波長は326 nmから334 nmにシフトしている。これと全く同様の長波長シフトがp1、p2およびp3試料でも観察された(パネルB-D)。つまり逆相HPLCによって分離した各リカバリン試料はCa<sup>2+</sup>の結合能を保持しており、Ca<sup>2+</sup>の結合に伴ってほぼ同様の構造変化が起ることが確認された。

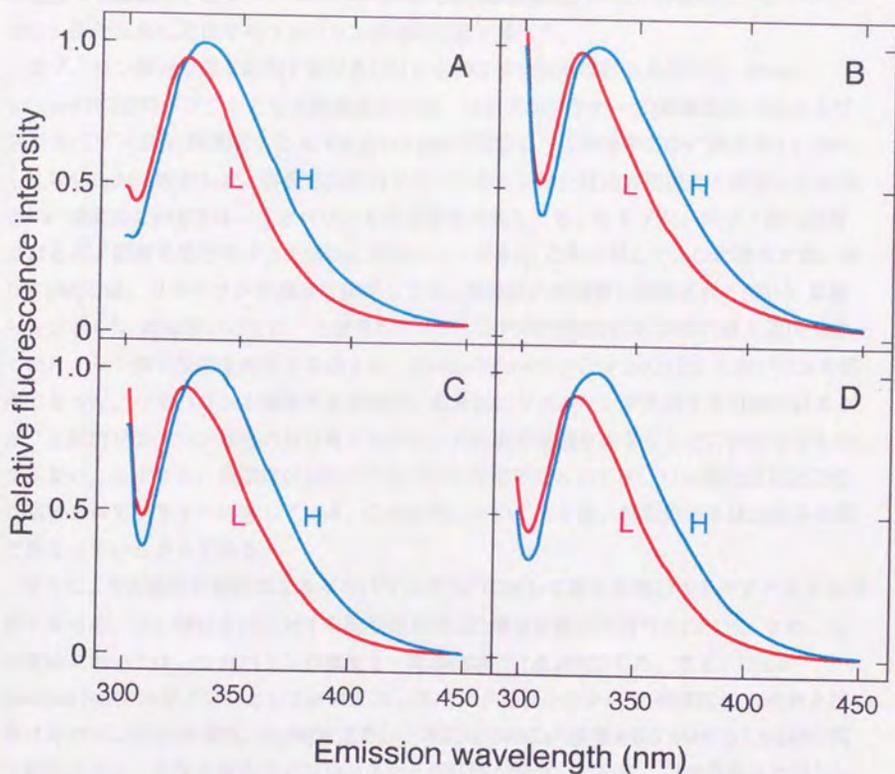


図9 リカバリンのトリプトファン残基に由来する蛍光エミッションスペクトル

リカバリン(終濃度 $0.3 \mu\text{M}$ )とCa/EGTA Bufferを混合し(合計 $3 \text{ ml}$ )、試料の遊離 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を $8.0 \mu\text{M}$ (高 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度; H)もしくは $0.1 \mu\text{M}$ (低 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度; L)に設定した。この試料を波長 $291 \text{ nm}$ の光で励起し、蛍光エミッションスペクトルを波長 $300 \text{ nm}$ から $450 \text{ nm}$ まで測定した。各パネルは、HPLCによって分離する前のリカバリン(パネルA)、p1(パネルB)、p2(パネルC)およびp3(パネルD)のスペクトルを示している。

### [3-3] N末端の脂肪酸構造がリカバリンの機能に及ぼす影響

前述したように、リカバリンは $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的にロドプシンのリン酸化反応速度を調節する(Kawamura *et al.*, 1993)。そこで、リカバリンのN末端脂肪酸構造の違いによって機能がどのように変化するかを検討した。具体的には、逆相HPLCによって分離精製した三成分のリカバリン(C14:0-リカバリン、C14:1-リカバリン、C14:2-/C12:0-リカバリン)を、ウシ網膜から精製したロドプシンキナーゼおよびUrea-washed ROSと再構成し、ロドプシンのリン酸化反応に及ぼす各リカバリン画分の効果を調べた。

まず、リン酸化反応を抑制するリカバリンの濃度依存性を検討した(図10)。Urea-washed ROS(ロドプシンとして終濃度20  $\mu\text{M}$ )、ロドプシンキナーゼ(終濃度40 nM)および各リカバリン画分(終濃度1, 2, 4, 6または8  $\mu\text{M}$ )を混合し、反応液中の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を0.2  $\mu\text{M}$ もしくは1.5  $\mu\text{M}$ に設定した。各反応液のロドプシンのリン酸化反応の初速度を測定した結果、低 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度(0.2  $\mu\text{M}$ )では、リカバリンを高濃度まで加えても、ロドプシンのリン酸化速度はほとんど影響を受けなかった(図10, 白抜きシンボル)。これに対して、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が高い時(1.5  $\mu\text{M}$ )には、リカバリンの濃度に依存してリン酸化反応が顕著に抑制された(図10, 黒塗りシンボル)。興味深いことに、三成分のリカバリンの間で抑制効果(抑制の最大値)が異なっており、リン酸化反応を抑制する強さは、C14:0->C14:1->C14:2-/C12:0-リカバリンの順序であった。リカバリンを精製する過程で、部分的にリカバリンが失活する可能性はあるが、上記のリカバリン活性の差は各リカバリンの失活の度合いが異なることに由来するものではない。なぜなら、高濃度(8  $\mu\text{M}$ )のリカバリン存在下においては、リン酸化反応は十分に阻害されてプラトーに達している。この状態においてもなお、抑制の強さは三成分の間で異なっているからである。

さらに、N末端脂肪酸の異なるリカバリンが $\text{Ca}^{2+}$ に対して異なる親和性を示すか否かを検討するため、リン酸化反応に対する抑制効果の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存性を調べた(図11)。なお、この実験においては、リカバリンの濃度を一定(終濃度で1.5  $\mu\text{M}$ )にした。まず、Urea-washed ROS(ロドプシンとして終濃度20  $\mu\text{M}$ )、ロドプシンキナーゼ(終濃度40 nM)および各リカバリン画分(終濃度1.5  $\mu\text{M}$ )を混合し、反応液中の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を0.3  $\mu\text{M}$ から1.5  $\mu\text{M}$ の間で変化させた。各反応液のロドプシンキナーゼ活性を測定した結果、三成分のリカバリンは、全て同じ $\text{Ca}^{2+}$ 濃度範囲(0.4  $\mu\text{M}$ ~0.8  $\mu\text{M}$ )においてロドプシンのリン酸化反応を抑制し、非常に類似した $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存性を示した(図11)。事実、50%の抑制活性を示す $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は、それぞれ0.53  $\mu\text{M}$  (C14:2-/C12:0-リカバリン)、0.56  $\mu\text{M}$  (C14:1-リカバリン)および0.53  $\mu\text{M}$  (C14:0-リカバリン)であり、大きな差異は認められなかった。以上の結果から、(i) リカバリンの2つの $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位の $\text{Ca}^{2+}$ に対する親和性やその協同性には脂肪酸の構造は大きな影響を与えないこと、(ii) ロドプシンのリン酸化反応を抑制する最大活性は三成分の間で異なること、が明らかになった。

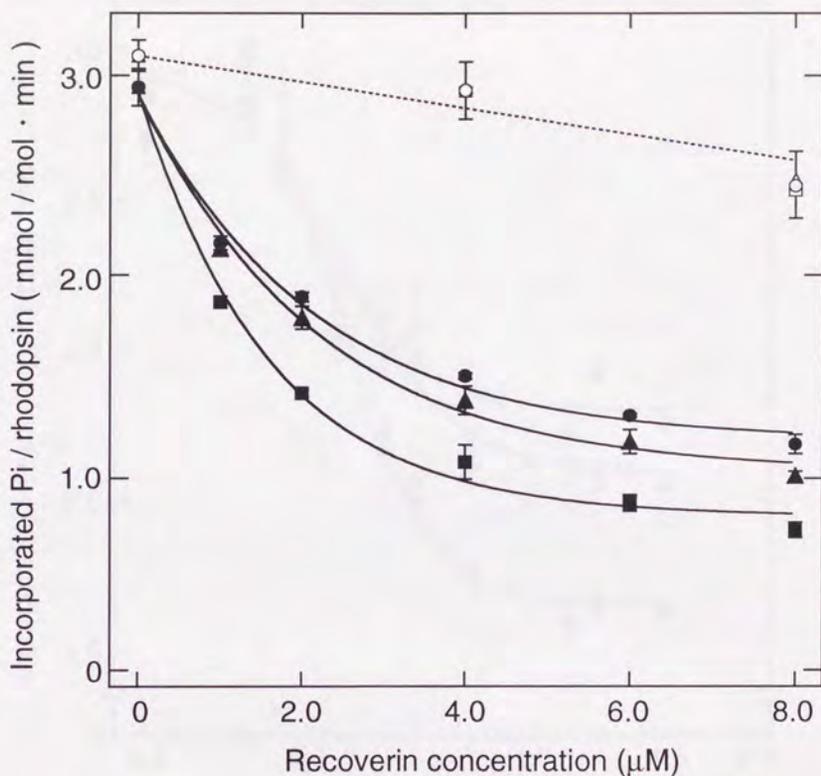


図10 ロドプシンのリン酸化抑制効果に及ぼすリカバリンのN末端脂肪酸構造の影響

Urea-washed ROS(ロドプシンの終濃度として20 μM)、ロドプシンキナーゼ(終濃度40 nM)、各リカバリン(C14:2-/C12:0-リカバリン[○●], C14:1-リカバリン[△▲]もしくはC14:0-リカバリン[□■]; 終濃度1, 2, 4, 6または8 μM)および $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (終濃度0.2 mM)を混合し(総液量50 μl)、25 °Cでリン酸化反応を行った。反応液中の遊離 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は、Ca/EGTA Bufferによって0.2 μM(白抜きシンボル)または1.5 μM(黒塗りシンボル)に設定した。グラフは、ロドプシンのリン酸化反応の初速度(縦軸)をリカバリン濃度(横軸)に対してプロットした。全ての点は、独立した4回の実験結果の平均値±S. D. として表示した。

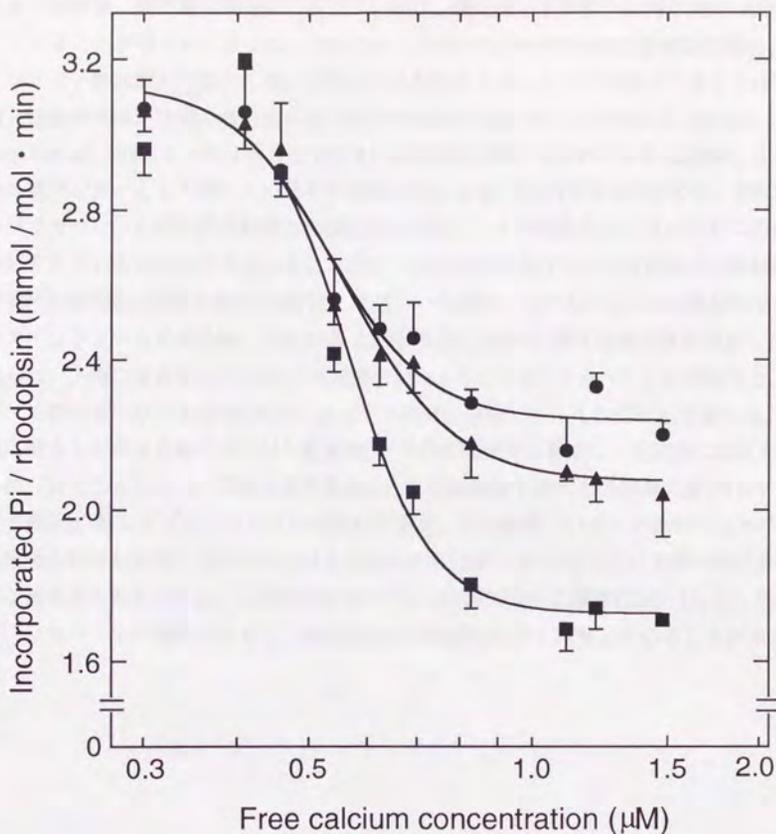


図11 リカバリンアイソフォームによるロドプシンのリン酸化反応抑制の  
Ca<sup>2+</sup>濃度依存性

Urea-washed ROS(ロドプシンの終濃度として20 μM)、ロドプシンキナーゼ(終濃度40 nM)、各リカバリン(C14:2-/C12:0-リカバリン[●]、C14:1-リカバリン[▲]もしくはC14:0-リカバリン[■]；終濃度1.5 μM)および $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP(終濃度0.2 mM)を混合し、リン酸化反応を様々な遊離Ca<sup>2+</sup>濃度で行った。グラフは、ロドプシンのリン酸化反応の初速度(縦軸)を遊離Ca<sup>2+</sup>濃度(横軸)に対してプロットした。全ての点は、独立した3回の実験結果の平均値±S. D. として表示した。また各点は最小二乗法を用いてHillの式に近似し、その近似曲線を示した。

### [3-4] N末端の脂肪酸構造がリカバリンの膜結合性に及ぼす影響

これまでの結果、脂肪酸の構造はロドプシンのリン酸化反応を抑制する強さ(最大活性)を調節していることが明らかになった。それでは、リカバリンN末端の脂肪酸構造の違いによってなゼリン酸化抑制の強さに違いが現われるのだろうか。ここで注目すべきことは、この最大活性の順序が各脂肪酸の疎水性の強さの順序(C14:0>C14:1>C14:2=C12:0; Heukeroth *et al.*, 1988)と一致することである。N末端脂肪酸がリカバリンを細胞膜につなぎとめる膜アンカーとして働くというモデル(Dizhoor *et al.*, 1993)を考え併せると、N末端脂肪酸がリカバリンと視細胞外節膜との親和性を調節し、その結果としてリカバリンの機能が修飾されている可能性がある。そこで次に、三成分のリカバリンと外節膜との親和性に及ぼすN末端構造の影響を調べた(図12)。まず、一定量のリカバリン(2 $\mu$ M; 4種類のリカバリンアイソフォームの混合物、方法の項【2-3】参照)と様々な濃度の外節膜を混合した後、遠心し、上清に含まれる(つまり、外節膜に結合しなかった)リカバリンを回収した。さらに、このリカバリンを逆相HPLCによって三成分に分離して、それぞれを定量した。外節膜に結合しなかった各リカバリン量を3ピークの面積値から算出し、反応液に加えた全量から差し引くことによって膜結合量を求めた。この結合量を加えた外節膜の量(ロドプシン濃度で表示)に対してプロットしたのが図12である。その結果、いずれの画分のリカバリンも外節膜と結合したが、C14:0->C14:1->C14:2-/C12:0-リカバリンという順で膜結合性に顕著な差が見られた(図12)。この順序はリカバリンの抑制活性の順序(図10, 11)と一致しており、リカバリンの膜結合性とリン酸化反応の抑制活性が深く関連していることが示された。

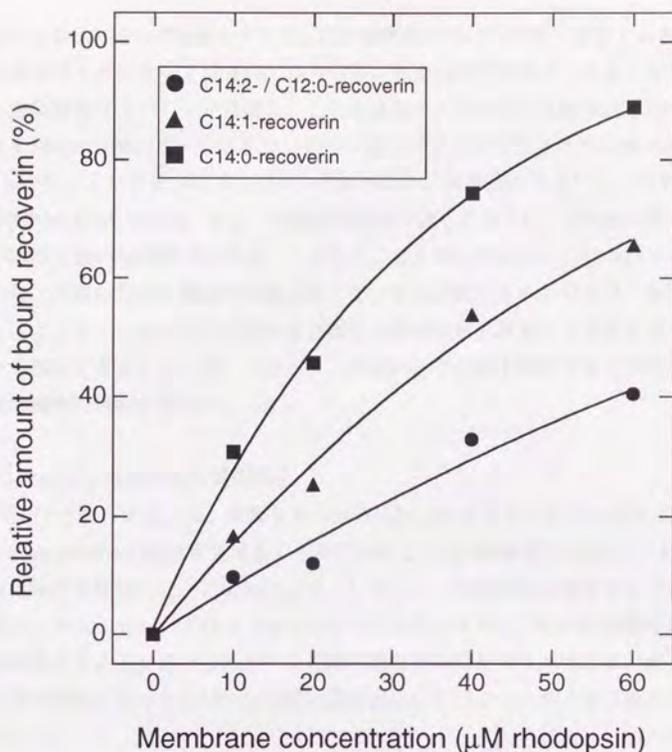


図12 リカバリンと外節膜との結合に及ぼすN末端の脂肪酸構造の影響

リカバリン(4種のアイソフォームの混合物として終濃度2 μM、方法の項【2-3】参照)をUrea-washed ROS(ロドプシンの終濃度として0, 10, 20, 40または60 μM)と混合し、混合液の遊離Ca<sup>2+</sup>濃度を5.6 μMに設定した(総液量50 μl)。この反応液を25 °Cで4分間インキュベートした後、遠心し、遠心上清(25 μl)を回収した。以上の操作は全て暗黒下で行なった。その後、遠心上清を逆相HPLCに供した(方法の項【2-4】参照)。逆相HPLCによって分離した三成分のリカバリンのピーク面積(相対値)を算出し、反応液に加えたリカバリンの総量(外節膜を加えなかった場合の上清の3ピークの各面積値)から差し引いた。このようにして推定した各アイソフォームの膜結合量を反応液に加えた外節膜の量(横軸: ロドプシンの濃度として表示)に対してプロットした。

## 「リカバリンの作用機構と膜結合性の役割」

リカバリンはN末端の脂肪酸を介して、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的に細胞膜と結合するが、この膜結合性の役割は明らかになっていない。リカバリンを大腸菌で発現させると、アシル化されていない未修飾のリカバリンが生成し、この未修飾のリカバリンは細胞膜と結合できない(Zozulya & Stryer, 1992)が、ロドプシンのリン酸化反応を抑制できる(Kawamura *et al.*, 1994)。しかし、ミスチル化リカバリンと比べると、未修飾のリカバリンの活性は著しく低下する(Chen *et al.*, 1995)。また、本論文の前節で示したように、N末端の疎水性はリカバリンの活性と強い相関関係がある。これらのことを考え併せると、リカバリンの膜結合はリカバリンの機能発現に重要な役割を担っていると推察できる。つまり、外節膜と結合することによって、リカバリンと標的蛋白質との親和性が上昇すると考えれば、上記の現象がうまく説明できる。そこで、リカバリンの膜結合の役割を解析すると同時に、リカバリンの作用機構の解明を試みた。

### 【3-5】リカバリンの標的蛋白質の同定

図10や図11で示したように、精製したリカバリン、ロドプシンキナーゼおよびロドプシンを含むUrea-washed ROSを再構成した系において、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合型リカバリンはロドプシンのリン酸化反応を抑制した。この結果から、リカバリンの標的蛋白質はロドプシンもしくはロドプシンキナーゼのいずれかであると推定できる。さらに、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合型リカバリンは外節膜と結合することから、リカバリンの標的蛋白質はロドプシンではないかと予想されたが、以下の実験によりリカバリンの標的蛋白質はロドプシンキナーゼであることが明らかになった。

ロドプシンキナーゼを含むG蛋白質共役受容体キナーゼ (G protein-coupled receptor kinases; GRKs)は、現時点で6つのグループに分類できる(表1; Inglese *et al.*, 1993)。*in vitro*においては、ロドプシンキナーゼ(GRK1)は $\beta$ アドレナリン受容体を含む数種類のG蛋白質共役受容体をリン酸化できる。逆に、GRK2~GRK6はロドプシンを含むいくつかの受容体をリン酸化するので、生体内では起こらない交差反応を*in vitro*で行わせることができる。

表1 G蛋白質共役受容体キナーゼ(GRKs)の特徴  
(Inglese *et al.* [1993] Table 1より改変)

サブタイプ	キナーゼの名称	<i>in vitro</i> での基質*	Gβγ 依存性
GRK1	Rhodopsin kinase	Rh, β <sub>2</sub> AR	-
GRK2	βARK1	Rh, β <sub>2</sub> AR, M <sub>2</sub> AChR, α <sub>2A</sub> AR, SPR	+
GRK3	βARK2	Rh, β <sub>2</sub> AR, M <sub>2</sub> AChR, SPR	+
GRK4	IT-11	?	-
GRK5	-	Rh, β <sub>2</sub> AR	-
GRK6	-	Rh, β <sub>2</sub> AR	-

\* Rh, ロドプシン; β<sub>2</sub>AR, β<sub>2</sub>-アドレナリン受容体; α<sub>2A</sub>AR, α<sub>2A</sub>-アドレナリン受容体;  
M<sub>2</sub>AChR, M<sub>2</sub>ムスカリン性アセチルコリン受容体; SPR, サブスタンスP受容体

そこで、ロドプシンキナーゼおよびβアドレナリン受容体キナーゼ1(βARK1)がいずれも、ロドプシンとβアドレナリン受容体をリン酸化する(Benovic *et al.*, 1986)ことに着目し、βARKによるロドプシンのリン酸化反応にリカバリンがどのような影響を及ぼすか調べた(図13)。Urea-washed ROS(ロドプシンとして終濃度20 μM)とβARK(終濃度40 nM)を混合し、反応液中のCa<sup>2+</sup>濃度を100 nMもしくは1.7 μMに設定した。各反応液のロドプシンのリン酸化反応の初速度を測定した結果、βARKによるロドプシンのリン酸化反応速度は、Ca<sup>2+</sup>およびリカバリンによって全く影響を受けなかった(図13, 白抜きバー)。また、ロドプシンキナーゼとは異なり、βARKは三量体G蛋白質βγサブユニット(Gβγ)によって活性化されることが知られている(Haga & Haga, 1990; Pitcher *et al.*, 1992)。そこで、ブタ脳由来のGβγ(終濃度400 nM)を反応液に加え、先程と同様にβARKによるロドプシンのリン酸化反応を行った(図13, 網掛けバー)。この場合、Gβγの添加によりロドプシンのリン酸化反応速度は全ての条件において上昇したが、この反応もまたCa<sup>2+</sup>/リカバリンによって全く影響を受けなかった。

次に、βアドレナリン受容体を各キナーゼによってリン酸化した場合の結果を図14に示した。この場合、先程とは対照的に、ロドプシンキナーゼによるβアドレナリン受容体のリン酸化反応が、Ca<sup>2+</sup>結合型リカバリンによって67%まで抑制された(図14, 黒塗りバー)。一方、βARKによるβアドレナリン受容体のリン酸化反応は、Ca<sup>2+</sup>/リカバリンにより影響を受けな

かった(図14, 網掛けバー)。以上、図13と図14の結果をまとめると、リカバリンによるリン酸化反応の抑制が観察されるのは、受容体キナーゼとしてロドプシンキナーゼを用いた場合のみであり、基質である受容体の種類には依存しないと結論できた。このことは、リカバリンがロドプシンキナーゼと特異的に相互作用し、その結果として受容体とロドプシンキナーゼとの会合が阻害されたことを示している。



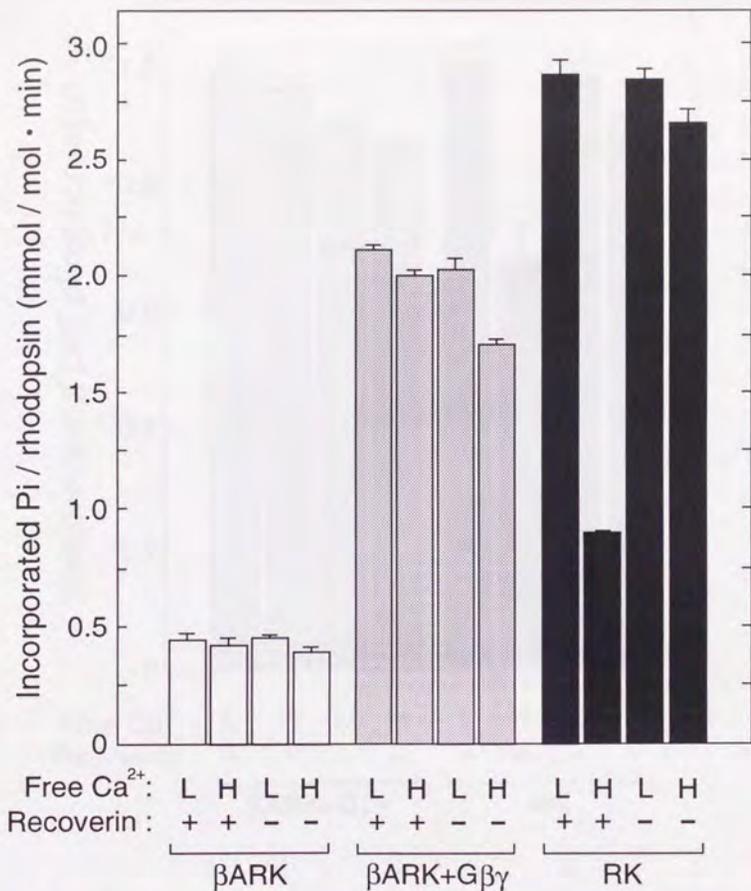


図13 受容体キナーゼによるロドプシンのリン酸化反応速度に及ぼす

Ca<sup>2+</sup>/リカバリンの効果

ロドプシンキナーゼ(終濃度16 nM; RK)もしくはβアドレナリン受容体キナーゼ(終濃度40 nM; βARK)をUrea-washed ROS (ロドプシンの終濃度として20 μM)と混合し(総液量50 μl)、リカバリン非存在下(-)もしくはリカバリン存在下(+; 終濃度6 μM)でリン酸化反応を行った。βARKによりロドプシンをリン酸化する場合、G蛋白質βγサブユニットを添加した条件(400 nM; βARK + Gβγ)でも行った。反応液中の遊離Ca<sup>2+</sup>濃度は、Ca/EGTA Bufferによって0.1 μM (L)または1.7 μM (H)に設定した。ロドプシンのリン酸化反応の初速度は、独立した2回の実験結果の平均値とエラーバーで示した。

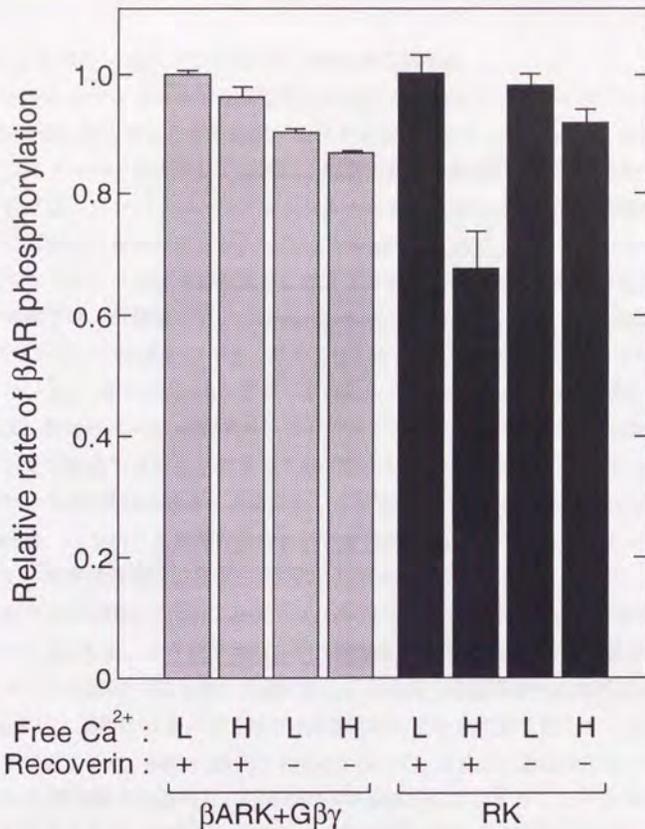


図14 受容体キナーゼによるβアドレナリン受容体のリン酸化反応速度に及ぼす Ca<sup>2+</sup>/リカバリンの効果

リン脂質膜に再構成したβアドレナリン受容体(終濃度3.6 nM)にロドプシンキナーゼ(終濃度8 nM; RK)もしくはβアドレナリン受容体キナーゼ(終濃度1.7 nM; βARK)を加え(総液量50 μl)、リカバリン非存在下(-)もしくはリカバリン存在下(+;終濃度6 μM)でリン酸化反応を行った。βARKによるリン酸化反応はGβγ存在下(400 nM; βARK + Gβγ)で行った。反応液中の遊離Ca<sup>2+</sup>濃度は、Ca/EGTA Bufferによって0.1 μM (L)または1.7 μM (H)に設定した。βARKおよびロドプシンキナーゼによるリン酸化反応の初速度はそれぞれ独立に、リカバリン存在下でCa<sup>2+</sup>濃度0.1 μM(Lの条件)におけるリン酸化速度を1.0として相対値(独立した2回の実験結果の平均値とエラーバー)で示した。なお、リカバリン存在下でCa<sup>2+</sup>濃度0.1 μMにおけるリン酸化反応の初速度はそれぞれ、2.25±0.07 (RKの場合)および7.86±0.02 (βARK + Gβγの場合) mmol mol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>であった。

### [3-6] リカバリン/ロドプシンキナーゼ複合体の膜局在

ロドプシンキナーゼは水溶性蛋白質であるが、ロドプシンの光刺激に伴って基質であるメタII中間体と結合するため外節膜へ移行すると考えられている(Kühn, 1978)。つまり、ロドプシンキナーゼとリカバリンは共に、細胞質画分と膜画分との間を移動する蛋白質である。それでは、リカバリンとロドプシンキナーゼとの複合体はいずれの画分において、どのように形成されるのだろうか。このことを調べるために、 $Ca^{2+}$ およびリカバリン存在下でロドプシンキナーゼが水溶性画分に存在するのか、または膜画分に存在するのか検討した。本実験では、外節膜としてはUrea-washed ROSを用いた。まず、Urea-washed ROS(ロドプシンとして終濃度20  $\mu M$ )、ロドプシンキナーゼ(終濃度20 nM)および様々な濃度のリカバリン(0.1 または6  $\mu M$ )を混合して遠心し、上清(図15 パネルA, 網掛けバー)および膜画分(同, 黒塗りバー)に回収されたロドプシンキナーゼ活性をそれぞれ測定した。以上の操作は、全て暗黒下で行ったのでメタII中間体は生成しておらず、したがってロドプシンキナーゼがメタII中間体に結合した結果として膜画分から回収されることはない。

その結果、リカバリン非存在下においては、約70%のロドプシンキナーゼ活性は、 $Ca^{2+}$ 濃度によらず水溶性画分に存在した(図15 パネルA, aとb)。これに対して、1.0  $\mu M$ のリカバリン存在下( $Ca^{2+}$ 濃度1.7  $\mu M$ )においては、63%のロドプシンキナーゼ活性が膜画分から回収された(図15, c)。さらにリカバリンの濃度を増やす(6.0  $\mu M$ )と、膜画分に存在するロドプシンキナーゼは80%にも達した(図15, d)。このような膜画分への移行は、低 $Ca^{2+}$ 濃度(0.1  $\mu M$ )では、過剰のリカバリン(6.0  $\mu M$ )が存在しても全く見られなかった(図15, e)。ここで着目すべきことは、高 $Ca^{2+}$ 濃度(1.7  $\mu M$ )において、反応液に加えたリカバリン(6.0  $\mu M$ )の約80%は水溶性画分に存在し、約20%のみが膜画分に存在することである(図15, パネルB)。それにもかかわらず、ロドプシンキナーゼの大部分(80%)は膜画分に存在した(パネルA, d)。もしロドプシンキナーゼが、水溶性リカバリンに対しても、膜結合型リカバリンに対しても同じ親和性を示し、そのうえ複合体を形成することによって、もう一方の画分に移行することがなければ、2つの画分におけるロドプシンキナーゼの分布はリカバリンの分布と一致するはずである。ところが、図15で示したように、リカバリンとロドプシンキナーゼの局在性に大きな違いが見られた。この原因として以下の二つの可能性が考えられる。(i)ロドプシンキナーゼは水溶性リカバリンよりも膜に結合したリカバリンに対して高い親和性をもつ。あるいは、(ii)ロドプシンキナーゼとリカバリンが複合体を形成すると細胞膜との親和性が上昇し、キナーゼと会合していないリカバリンよりも優先的に膜へ移行する。このいずれにせよ、リカバリンとロドプシンキナーゼとの複合体は、細胞膜上に局在すると結論できた。

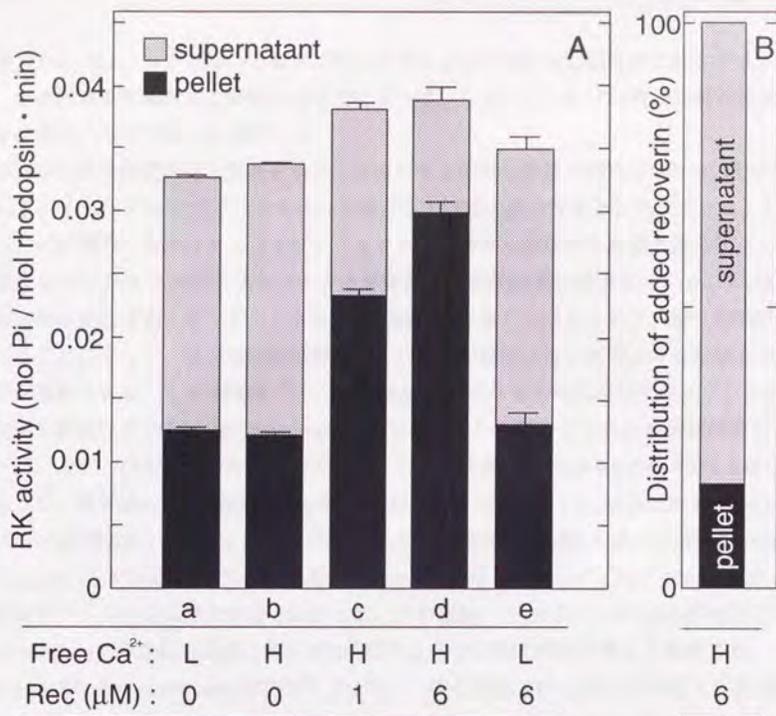


図15 Ca<sup>2+</sup>およびリカバリン依存的なロドプシンキナーゼの膜移行

パネルA: ロドプシンキナーゼ(終濃度20 nM)、Urea-washed ROS (ロドプシンの終濃度として20 μM)および様々な濃度のリカバリン(0, 1.0 または6.0 μM)を混合し(混合液組成: 50 mM Tris, 6.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml ovalbumin, 0.004 % (v/v) Tween 80, 5.04 mM EGTA; pH 7.9; 総液量50 μl)、混合液中の遊離Ca<sup>2+</sup>濃度をCa/EGTA Bufferによって0.1 μM (L)または1.7 μM (H)に設定した。この反応液を暗黒下にて25 °Cで4分間インキュベートした後に遠心(39,000xg, 10 min at 4 °C)し、上清(45 μl)を回収した。この上清にUrea-washed ROSおよび[γ-<sup>32</sup>P]ATPを添加し、リン酸化反応(反応液組成: 50 mM Tris, 6.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml ovalbumin, 0.002 % (v/v) Tween 80, 8.0 mM EGTA, 3.6 mM Ca<sup>2+</sup>, 7.1 μM ロドプシン, 0.2 mM [γ-<sup>32</sup>P]ATP; pH 7.9; 総液量70 μl)を行って、上清(水溶性画分)に分布したキナーゼ活性を求めた。一方、遠心操作で得られた沈殿は、上記の反応液組成と同じになるような溶液で再懸濁し、同様にリン酸化反応を行って、沈殿(膜画分)に分布したキナーゼ活性を求めた。これらの反応液の遊離Ca<sup>2+</sup>濃度は、10 nM以下であり、リカバリンによるロドプシンキナーゼ活性の阻害は起こらない条件である。水溶性画分(網掛けバー)および膜画分(黒塗りバー)のキナーゼ活性(ロドプシンのリン酸化速度)は、独立した2回の実験結果の平均値とエラーバーで示した。パネルB: パネルAの実験dの水溶性画分(網掛けバー)および膜画分(黒塗りバー)をSDS-PAGEに供し、両画分に含まれるリカバリンの相対量(合計を100%とした)をクマジー染色したバンドのデンストメトリーから求めた。

前述したように、リカバリンとロドプシンキナーゼとの複合体は細胞膜に局在する。そこで、この複合体が細胞膜と結合することによって、リカバリンのリン酸化抑制活性が変化するか否か、以下のように検討した。

反応液中の外節膜濃度を上昇させると、リカバリンの膜結合量は増大し(図12)、その結果として、リカバリン/ロドプシンキナーゼ複合体の膜結合量も増えると予想される。したがって、一定量のリカバリンとロドプシンキナーゼを様々な濃度の外節膜と混合すると、膜に結合したリカバリン/ロドプシンキナーゼ複合体と水溶性(膜に結合していない)の複合体の存在比が変化する。そこで、これら各反応液におけるリカバリンのリン酸化抑制活性を調べることによって、複合体の膜結合がリカバリンの抑制活性にどのような影響をおよぼすのか検討できる。なお本実験では、Urea-washed ROSを加熱処理してロドプシンなどの蛋白質を熱変性させたboiled membraneを、リカバリンを結合させるための膜成分として用いた。また、ロドプシンキナーゼの基質として、低濃度のUrea-washed ROSを反応液に添加した。具体的には、Urea-washed ROS(ロドプシンとして $1.0\ \mu\text{M}$  [ $0.038\ \text{mg/ml}$ ])、リカバリン(終濃度 $6.0\ \mu\text{M}$ )およびロドプシンキナーゼ(終濃度 $20\ \text{nM}$ )を種々の濃度のboiled membrane( $0 - 0.76\ \text{mg/ml}$ )と混合し、高 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度( $1.7\ \mu\text{M}$ )下において、ロドプシンキナーゼによるロドプシンのリン酸化速度を測定した。その結果、リカバリン( $6.0\ \mu\text{M}$ )存在下では、boiled membraneの濃度の上昇に伴ってロドプシンのリン酸化反応が著しく抑制され、 $0.76\ \text{mg/ml}$ のboiled membrane存在下においてリン酸化速度は約10%にまで低下した(図16 パネルA, ●)。これに対して、リカバリン非存在下においては(パネルA, ○)、高濃度( $0.76\ \text{mg/ml}$ )のboiled membraneを添加してもロドプシンキナーゼ活性は若干抑制されるにとどまった。つまりリカバリン存在下において、膜濃度の上昇に伴ってロドプシンのリン酸化反応が強く抑制されたことから、リカバリン-ロドプシンキナーゼ複合体の膜結合量の増加に伴って、ロドプシンキナーゼ活性が効果的に抑制されることが示された。

さらに、複合体の膜結合にともなって、リカバリンの $\text{Ca}^{2+}$ に対する親和性が変化するか否か調べるため、boiled membrane非存在下(図16 パネルB, △)または存在下( $0.76\ \text{mg/ml}$ , ▲)において、リン酸化反応抑制の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存性を調べた。その結果、boiled membraneの有無にかかわらず、同じ $\text{Ca}^{2+}$ の濃度範囲でリン酸化反応は抑制され、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存性は変化していないことが示された(図16 パネルB)。以上の結果から、リカバリン/ロドプシンキナーゼ複合体の膜結合によって、(i) リカバリンと $\text{Ca}^{2+}$ との親和性は影響を受けないこと、(ii) ロドプシンキナーゼの活性は効果的に抑制されること、が示された。

以上、リカバリンはロドプシンキナーゼと直接的に相互作用し、さらにロドプシンキナーゼを細胞膜上につなぎとめることによってキナーゼ活性を効果的に抑制することが明らかになった。

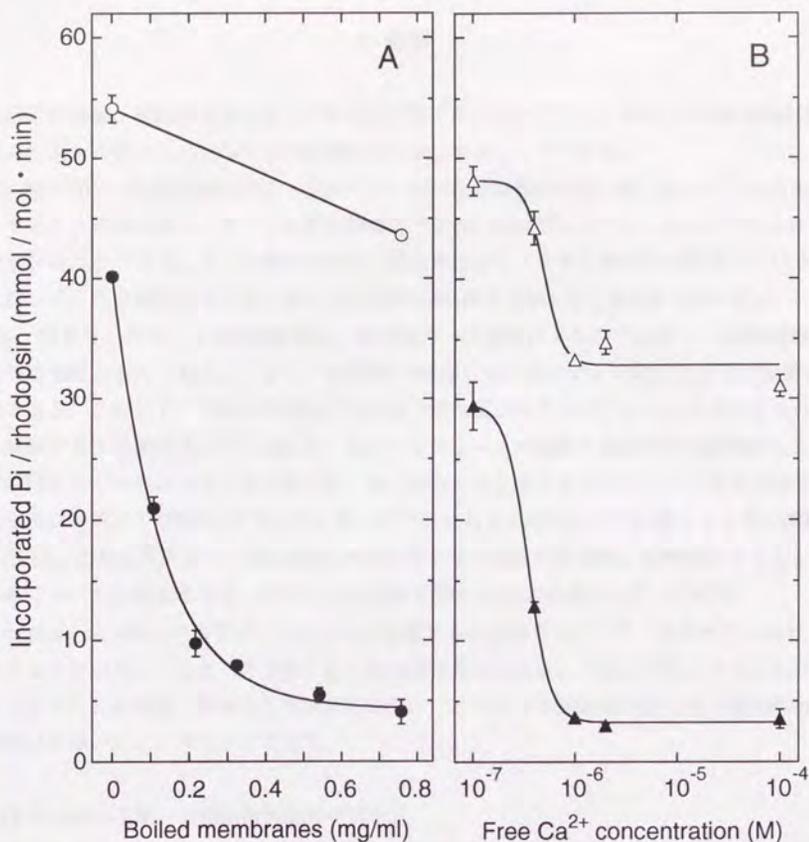


図16 ロドプシンのリン酸化反応抑制に及ぼすリカバリンの膜結合の影響

実験に先立って、Urea-washed ROSを90°Cで10分間加熱処理し、boiled membraneを作成した。パネルA: リカバリン存在下(6.0 μM, ●)または非存在下(○)において、Urea-washed ROS(ロドプシンの終濃度として1.0 μM)、ロドプシンキナーゼ(終濃度20 nM)および種々の濃度のboiled membrane(0~0.76 mg/ml)を混合し、リン酸化反応を行った。反応液の遊離Ca<sup>2+</sup>濃度は、1.7 μMに設定した。グラフの横軸は、boiled membraneに含まれるロドプシン(熱変性している)の濃度を表している。なお、0.76 mg/mlのboiled membraneは20 μMのロドプシンを含むUrea-washed ROSに相当する。パネルB: boiled membrane存在下(0.76 mg/ml, ▲)または非存在下(△)において、Urea-washed ROS(ロドプシンの終濃度として1.0 μM)、ロドプシンキナーゼ(終濃度20 nM)およびリカバリン(終濃度6.0 μM)を混合し、様々なCa<sup>2+</sup>濃度においてリン酸化反応を行った。全ての点は、独立した2回の実験結果の平均値とエラーバーで表示した。

#### 4. 考察

本研究の結果、視細胞特異的なCa<sup>2+</sup>結合蛋白質であるリカバリンの不均一なN末端脂肪酸修飾の役割およびリカバリンの作用機構を明らかにすることができた。

N末端の不均一な脂肪酸修飾は、リカバリンやTαなど視細胞の蛋白質においてのみ見出されており、非常に珍しいタイプの脂肪酸修飾である。興味深いことに、同じAキナーゼ触媒サブユニットでも、ウシ心臓や肺由来の蛋白質にはミリスチン酸のみが結合しているのに対して、ウシ網膜由来の蛋白質には4種類の脂肪酸が付加している(Johnson *et al.*, 1994)。つまり、不均一な脂肪酸修飾は、蛋白質の一次構造によるのではなく、組織(細胞)特異的な現象と考えられる。しかし、視細胞に4種類の修飾脂肪酸が存在する生理的意義は、不明である。これまで、不均一な修飾構造を持つ蛋白質の各アイソフォームをそれぞれ分離・精製することができなかつたため、各アイソフォームの機能を直接的に比較解析した研究は行われていなかった。本研究では、種々のカラムクロマトグラフィーを試みた結果、逆相カラムを用いて4種類のリカバリンアイソフォームを三成分にまで分離することに成功した(図5)。この成果により、N末端構造の異なる分子の機能を直接的に比較解析することが可能になった。残念ながら、同じような手法を用いてTα(未発表データ)やGCAP (Gorczyca *et al.*, 1994)の各アイソフォームを分離することはできないが、逆相カラム以外のカラムを用いることによって分離できる可能性は充分にある。このように、リカバリンアイソフォームを分離・精製した本研究の成果は、このような脂質修飾蛋白質の機能解析に突破口を開いたといえることができる。

##### [4-1] N末端の不均一な脂肪酸修飾のプロセス

前述したように、N末端の不均一な脂肪酸修飾はN-ミリスチル化の組織特異的なバリエーションである。従来からよく知られているN末端のミリスチル化は次の二段階の反応によって完成する(Johnson *et al.*, 1994)。まず、ミリスチル化蛋白質はN末端にMet-Gly-X-X-X-Ser/Cys- (Xは任意のアミノ酸)というコンセンサス配列をもち、翻訳中に開始Metが切断除去される。この構造がN-ミリスチル転移酵素によって認識され、新たにN末端に露出したGlyのα-アミノ基にミリスチルCoAからミリスチン酸が転移する(図17)。

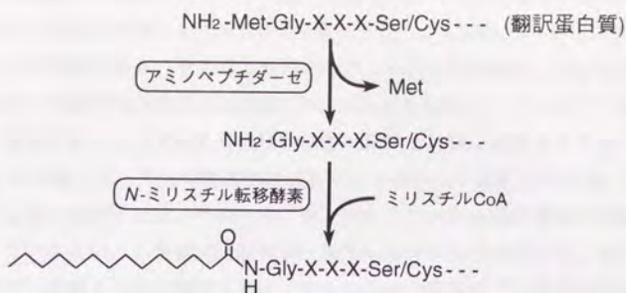


図17 N-ミリスチル化の修飾反応過程

蛋白質の(おそらく翻訳中に)N末端のメチオニンが切断除去され、新たにN末端にグリシンが露出する。この近傍の構造をN-ミリスチル転移酵素が認識し、ミリスチルCoAを基質として、N末端のグリシンのα-アミノ基にミリスチン酸をアミド結合を介して付加する。

N末端の脂肪酸構造

	Bovine <sup>1</sup> T <sub>α</sub>	Frog <sup>2</sup> T <sub>α</sub>	Bovine <sup>3#</sup> Recoverin	Bovine <sup>2§</sup> Recoverin	Human <sup>2</sup> Recoverin	Bovine <sup>4</sup> GCAP	Bovine <sup>2</sup> C-subunit
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<chem>CCCCCCCCCCCC(=O)N-Gly-</chem> C14:0	5	—	43	10	36	7	57
<chem>CCCCCCCC=CCCC(=O)N-Gly-</chem> C14:1 (5-cis)	30	—	28	48	21	30	15
<chem>CCCCC=CC=CCCC(=O)N-Gly-</chem> C14:2 (5-cis, 8-cis)	35	100	} 29	} 43	39	50	21
<chem>CCCCCCCCCCCC(=O)N-Gly-</chem> C12:0	23	—			4	13	7

図18 視細胞の蛋白質のN末端に結合した4種類の脂肪酸の組成比

<sup>1</sup>Kokame *et al.* (1992), <sup>2</sup>Johnson *et al.* (1994), <sup>3</sup>Sanada *et al.* (1995), <sup>4</sup>Palczewski *et al.* (1994).

#: 図5のピーク面積値より求めた。視細胞外節に由来するリカバリンの分析結果。§: 網膜全体から単離したリカバリンの分析結果。

現在のところ、このN-ミリスチル化と同様の過程を経由して、視細胞内の蛋白質が不均一に修飾されると考えられるが、そのプロセスは明らかになっていない。この不均一な修飾反応を触媒する酵素の性質として次の2つが考えられる。1つは、N-ミリスチル転移酵素のアイソザイムが複数存在し、それぞれが特定のアシルCoAを基質としているという可能性。もう1つは、1種類の転移酵素が4種類のアシルCoAを基質としているという可能性である。これまで酵母のN-ミリスチル転移酵素の基質特異性は詳細に研究されてきた(Kishore *et al.*, 1991)。この酵素は、アシル基供与体としてC14:0-CoAを基質とするが、C14:1-CoAやC12:0-CoAも良い基質となる。そのため、単一のN-ミリスチル転移酵素が複数の脂肪酸修飾を触媒しているという、後者の可能性が一般的に受け入れられている。もしウシ視細胞の転移酵素が一種類であると仮定すると、アシルCoAの細胞内プールの存在比によってN末端に結合する脂肪酸組成が決定されている可能性がある。N末端の脂肪酸の組成比は、最初にウシT $\alpha$ で報告され(Kokame *et al.*, 1992)、さらに本研究によってウシリカバリンについて明らかになった(図5)。ウシT $\alpha$ の場合は、5% (C14:0), 30% (C14:1), 35% (14:2), 23% (12:0)であり、ウシリカバリンにおいては、43% (C14:0), 28% (C14:1), 29% (14:2と12:0の和)である。このように、T $\alpha$ とリカバリンの組成比は互いに大きく異なっており、アシルCoAの細胞内プールの存在比によってのみN末端に結合する脂肪酸が決定されているわけではなさそうである。現在では、視細胞由来の他の蛋白質についても、脂肪酸の組成比が推定されており(図18)、同じウシ網膜由来であってもT $\alpha$ 、リカバリン、GCAP およびAキナーゼの触媒サブユニット(C-サブユニット)の間で組成比は大きく異なっている(図18)。興味深いことに、リカバリンにおいては、視細胞外節由来のリカバリンと網膜全体から単離したリカバリン(Johnson *et al.*, 1994)では、脂肪酸組成が大きく異なる(図18)。リカバリンは視細胞の外節だけでなく、細胞体全体に発現していることが免疫組織学的研究により明らかになっており<sup>2)</sup>(Dizhoor *et al.*, 1991; Polans *et al.*, 1993; Kawamura *et al.*, 1996)、外節と内節では脂肪酸の組成比が大きく異なっていると考えられる。このように、N末端の脂肪酸修飾は予想以上に複雑な機構によって調節されているのであろう(Sanada & Fukada, 1995)。

---

<sup>2)</sup> 視細胞の中で外節以外に存在するリカバリンの機能は明らかにされていない。

#### 【4-2】不均一なN末端修飾がリカバリンの機能に及ぼす影響

細胞膜上での生体情報変換に関する蛋白質の多くは、脂肪酸やイソプレノイドによる修飾を受けている(Towler *et al.*, 1988)。これらシグナル伝達蛋白質に共有結合した多様な脂質は、蛋白質を細胞膜につなぎとめる膜アンカーとして機能したり、特定の分子間の相互作用に重要な役割を果たしている(深田, 1993; 真田 & 深田, 1996a)。本研究において、脂肪酸構造の異なるリカバリンの機能を比較解析した結果、ロドプシンのリン酸化反応を抑制する強さ、および細胞膜との親和性はともに、C14:0->C14:1-> C14:2-/C12:0-リカバリンの順序であった(図10-12)。この順序は修飾脂肪酸の疎水性の順序(C14:0 > C14:1 > C14:2 = C12:0)と見事に一致している。つまり、修飾脂肪酸の疎水性が、リカバリンの機能に重要な役割を果たしていることが明らかになった。最近、アシル化ペプチドの脂質膜に対する結合力が物理化学的手法を用いて測定されており(Peitzsch *et al.*, 1993)、アシル化ペプチドのリン脂質膜との結合に伴う自由エネルギー変化は、アシル基の鎖長および疎水性に依存して上昇することが明らかになっている。この事実は、上述したリカバリンアイソフォームと外節膜との親和性を調べた結果(図12)とよく符合する。また、リカバリン/ロドプシンキナーゼ複合体が細胞膜と結合するとキナーゼ活性が強く抑制される(図16および後述)という結果は、細胞膜との親和性が高いアイソフォームほどキナーゼ活性に対する抑制効果が強いという実験結果(図10と図11)をうまく説明できる。このようにリカバリンの場合、N末端脂肪酸の構造、特にその疎水性の強さがリカバリンと細胞膜との親和性を調節し、その結果としてロドプシンキナーゼ活性を巧妙に調節していると結論できた(Sanada *et al.*, 1995)。

#### 【4-3】リカバリンの作用機構

本研究においては、Ca<sup>2+</sup>結合型リカバリンの標的蛋白質がロドプシンキナーゼであることを明らかにした(図13, 14)。また、この両者の複合体は細胞膜上で形成され(図15)、ロドプシンキナーゼがリカバリンによって細胞膜上につなぎとめられることが判明した。さらに、両者の複合体が細胞膜と結合することによってロドプシンキナーゼ活性が効果的に抑制されることを見出した(図16)。この原因として、膜結合によってリカバリンとロドプシンキナーゼとの安定的な複合体が形成されたためと考えられる。もしくは、リカバリンが細胞膜上に濃縮されたために、細胞膜周辺でのリカバリン濃度が上昇したためとも考えられる。

これらのことを考え併せると、リカバリンがCa<sup>2+</sup>濃度依存的に細胞質と円板膜の間を移行する現象の生理的役割については、以下の3点が推察される(図19)。

[1] 暗時(高Ca<sup>2+</sup>濃度時)、リカバリン/ロドプシンキナーゼ複合体が円板膜に結合することによってロドプシンキナーゼが効果的に抑制される。そのため、メタII中間体の不活性化が

強く抑えられて光感受性が顕著に高くなる。

[2] 光刺激に伴って細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度が低下すると、円板膜上でリカバリンにトラップされて濃縮されていたロドプシンキナーゼはリカバリンから遊離し、速やかに同じ膜上にあるロドプシンをリン酸化できる。つまり、ロドプシンの不活性化が効率良く行われる。

[3] 光刺激に伴ってロドプシンキナーゼはメタII中間体をリン酸化するが、リン酸化した後、細胞質へ移行する(Buczylko *et al.*, 1991)。ここで、光刺激の停止に伴って $Ca^{2+}$ 濃度が再び上昇した場合、細胞質に存在するロドプシンキナーゼをリカバリンが速やかにトラップして円板膜につなぎとめる。

以上、リカバリンおよびロドプシンキナーゼの $Ca^{2+}$ 濃度依存的な細胞質 - 膜間移行は、光情報の遮断と明暗順応に大きく寄与していると考えられる。

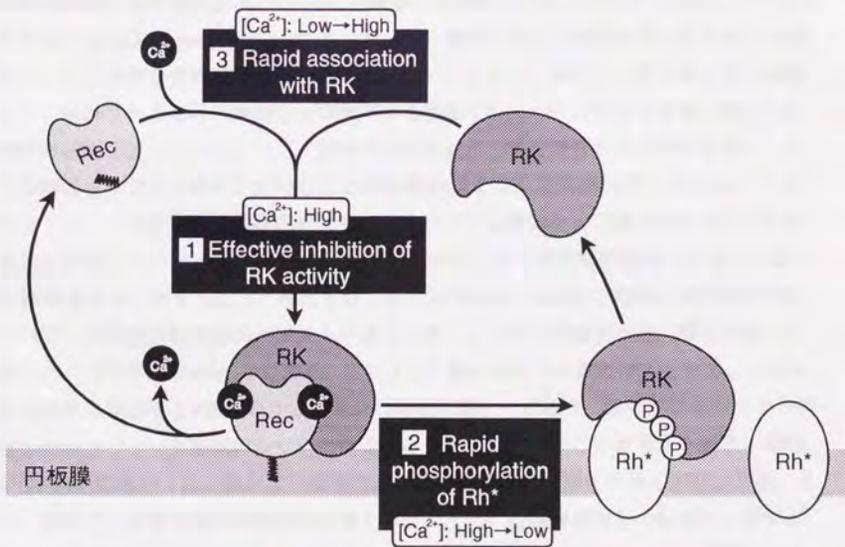


図19 細胞質と円板膜の間の $Ca^{2+}$ 濃度依存的なリカバリンの移行

#### 【4-4】不均一なN末端修飾の生理的意味

N末端の修飾脂肪酸としては、ミリスチン酸(C14:0)がよく知られているが、ミリスチン酸の細胞内含量は炭素数16や炭素数18の脂肪酸と比べて極端に低い(Boyle & Ludwig, 1962)。それにもかかわらず、生体がN末端の修飾脂肪酸としてミリスチン酸を利用している理由は以下のように考えられている。ミリスチン酸は、より鎖長の長い脂肪酸と比較して疎水の性質が弱く、ミリスチル化蛋白質が細胞膜と可逆的に解離・会合するのに大きく寄与している。事実、低分子量G蛋白質ARFやSrcファミリーに属する蛋白質など、多くのミリスチル化蛋白質は細胞膜(や標的蛋白質)と可逆的に結合する(McLaughlin & Aderem, 1995)。このことを基にして考えると、ミリスチン酸よりも疎水性の低い脂肪酸によって視細胞の蛋白質が修飾されることにより、細胞膜または標的蛋白質との可逆的な解離・会合のターンオーバー速度が上昇するのではないかと推定できる。つまりミリスチン酸以外の脂肪酸修飾は、迅速かつ効率の良い光情報の伝達と遮断に役立っているのではないだろうか。しかし、なぜ4種類もの脂肪酸が必要なのか?という問いにはまだ答えられていない。もし、リカバリンの局在している場所に応じて、4種類のリカバリンの組成が巧妙に調節されていると仮定すると、以下のように考えられる。

脊椎動物網膜には桿体と錐体と呼ばれる2種類の視細胞があり、両者の光応答には大きな違いがある(Baylor & Nunn., 1982)。つまり桿体は、錐体に比べて細胞興奮に至るまでの潜時は長く、また興奮からの回復に要する時間も長い。しかし、わずかな光を最大限に増幅するように設計されており、微弱な光環境下でも機能する。つまり桿体は薄暗い光のもとでの薄明視機能を担っている。一方、錐体の潜時は短く、また興奮からの回復も速い。しかし光の増幅度は低く、明るい光のもとでの視覚(色覚を含む昼間視)を担っている。リカバリン抗体を用いた免疫組織学的研究により、リカバリンは桿体および錐体のいずれにも存在することが明らかになっている(Dizhoor *et al.*, 1991)。また哺乳類の網膜では桿体の量が錐体の約10倍あるいはそれ以上と考えられており(Krebs & Friedrich, 1982)、本研究で用いたリカバリンの大部分は桿体外節由来と予想される。この点を考慮すると、桿体外節に存在するリカバリンの約40%がミリスチン酸によって修飾されていると考えられる。もし桿体および錐体に存在する4種類のリカバリンの組成が異なっており、錐体ではミリスチン酸が結合したリカバリンが極端に少ないと仮定すると以下のようなことが考えられる。暗時(高Ca<sup>2+</sup>濃度時)においては、錐体より桿体の方が光受容体のリン酸化は強く抑制される。その結果、桿体の方が光情報の増幅効率が高くなる。また、細胞興奮からの回復は、桿体より錐体の方が速やかに起こる。このように考えると、桿体および錐体における光情報の増幅効率および興奮からの回復速度の違いがうまく説明できる。今後、桿体と錐体でリカバリンの組成がどのように異なるのか検討してゆく必要がある。また前述したように、同一の細胞であっても、外節と内節ではリカバリンアイソフォームの組成が大きく異なる可能

性がある。内節に特徴的な脂肪酸組成が、内節におけるリカバリンの機能発現に大きく寄与しているのかもしれない。ちなみに、リカバリンと同様、4種類の脂肪酸でN末端が修飾されている $T\alpha$ を研究対象として、当研究室では、この脂肪酸構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を作成することに成功している(Shouno *et al.*, 1996)。残念ながら、この抗体はリカバリンと交差反応を示さないが、リカバリンアイソフォームの局在を調べるために、同様のアプローチも有効であろう。また、図18で示したように、カエル視細胞の $T\alpha$ には、ウシやヒトの $T\alpha$ とは異なり、C14:2のみが結合している。つまり、細胞の機能や動物がおかれている生活環境に応じて、生体は4種類の脂肪酸を使い分け、多様な細胞内情報伝達系路を巧妙に調節しているのかも知れない。

#### [4-5] リカバリン類似蛋白質の生体における役割

ロドプシンなどG蛋白質共役受容体が特異的な受容体キナーゼによってリン酸化される現象、そして、リン酸化によって受容体が脱感作するという現象は生体内に広く普遍的にみられる。また最近、リカバリンと類似の蛋白質が視細胞(Kutuzov *et al.*, 1991; McGinnis *et al.*, 1992; Yamagata *et al.*, 1990; Kawamura *et al.*, 1996)だけでなく松果体(Goto *et al.*, 1990; Stepanik *et al.*, 1993; Bastianelli & Pochet, 1994)や脳神経細胞(Takamatsu *et al.*, 1992; Terasawa *et al.*, 1992; Kuno *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1992; Okazaki *et al.*, 1992; Lenz *et al.*, 1992; Pongs *et al.*, 1993)に存在することが明らかになってきた。これらは多様な神経機能において重要な役割を果たしていると考えられるが、現在のところその機能は判明していない。しかしこれらの蛋白質の一次構造はリカバリンと相同性を示すことから類似の機能を持つと想像できる。本研究において、リカバリンはロドプシンキナーゼとは相互作用するが、同じG蛋白質共役受容体キナーゼの仲間である $\beta$ アドレナリン受容体キナーゼとは相互作用しないことを示した(図13, 14)。すなわち、リカバリン類似蛋白質は組織特異的な受容体キナーゼと相互作用し、それぞれの組織において、G蛋白質共役受容体の脱感作を制御している可能性がある。これらのことから、本研究によって得られた知見は視細胞だけにとどまらず、神経系あるいはさらに広く生体における普遍的なメカニズムの解明にも貢献すると考えられる。

## 5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々の御指導と御協力を仰ぎました。

深田吉孝教授(東京大学大学院理学系研究科)には、私が学部四回生のころから今日まで、本研究の全般にわたって熱心に指導して頂きました。大阪大学蛋白質研究所の下西康嗣教授、高尾敏文助教授には、質量分析で全面的に協力して頂きました。東京大学医学部脳研究施設の芳賀達也教授、芳賀和子先生には、 $\beta$ アドレナリン受容体の精製およびリン酸化実験技法を教えていただきました。赤沼宏史教授、川戸佳教授には、実験機器を使用させていただきました。林利彦教授には、博士課程三年時に大変お世話になりました。京都大学大学院理学研究科の前田章夫教授、七田芳則助教授には、修士課程において大変お世話になりました。小亀浩市博士(現、国立循環器病センター)には、研究を始めた当初、実験技法のみならず研究者としての心構えを教えていただきました。松田孝彦博士(現、東京大学医科学研究所)には、研究を進めるうえで多くのアドバイスを頂きました。大学院生の清水史子さんにはリカバリンの作用機構を解明するうえで、実験を手伝って頂くと同時に、有意義な議論をして頂きました。また、京都大学での修士課程および東京大学での博士課程において、研究室の皆様のおかげで楽しい研究生活を送ることができました。

最後になりますが、ここまで育てて頂いた両親に感謝します。

## 6. 引用文献

- Ames, J. B., Tanaka, T., Porumb, T., Ikura, M. and Stryer, L. (1995b). Nuclear magnetic resonance evidence for  $Ca^{2+}$ -induced extrusion of the myristoyl group of recoverin. *J. Biol. Chem.* 270, 30909-30913
- Bastianelli, E. and Pochet, R. (1994). Calbindin-D28k, calretinin, and recoverin immunoreactivities in developing chick pineal gland. *J. Pineal Res.* 17, 103-111
- Baylor, D. A. and Nunn, B. (1982). Electrical signaling in vertebrate photoreceptors. *Methods Enzymol.*, 81, 403-423
- Bennett, N. and Sitaramayya, A. (1988). Inactivation of photoexcited rhodopsin in retinal rods: the roles of rhodopsin kinase and 48-kDa protein (arrestin). *Biochemistry*, 27, 1710-1715
- Benovic, J. L., Mayor Jr., F., Somers, R. L., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1986). Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by  $\beta$ -adrenergic receptor kinase. *Nature* 321, 869-872
- Benovic, J. L. (1990). Photoaffinity labelling and purification of the  $\beta$ -adrenergic receptor. *Receptor Biochemistry, a practical approach* (Hulme, E. C., ed) pp. 125-140, IRL Press, Oxford
- Boyle, J. J. and Ludwig, E. H. (1962). Analysis of fatty acids of continuously cultured mammalian cell by gas-liquid chromatography. *Nature* 196, 893-894
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Buczylko, J, Gutmann, C. and Palczewski, K. (1991). Regulation of rhodopsin kinase by autophosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 2568-2572
- Caldwell, P. C. (1970). in *Calcium and Cellular Function* (Cuthbert, A. W., ed) pp.10-16, St. Martin's Press, New York
- Calvert, P. D., Klenchin, V. A. and Bownds, M. D. (1995). Rhodopsin kinase inhibition by recoverin. *J. Biol. Chem.* 270, 24127-24129
- Cervetto, L., Lagnate, L., Perry, R. J., Robinson, D. W. and McNaughton, P. A. (1986). Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. *Nature* 337, 740-743
- Chen, C.-H., Inglese, J., Lefkowitz, R. J. and Hurley, J. B. (1995).  $Ca^{2+}$ -dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 18060-18066

- Dizhoor, A. M., Ray, S., Kumar, S., Niemi, G., Spencer, M., Brolley, D., Walsh, K. A., Philipov, P. P., Hurley, J. B. and Stryer, L. (1991). Recoverin : a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science* 251, 915-918
- Dizhoor, A. M., Ericsson, L. H., Johnson, R. S., Kumar, S., Olshevskaya, E., Zozulya, S., Neubert, T. A., Stryer, L., Hurley, J. B. and Walsh, K. A. (1992). The NH<sub>2</sub> terminus of retinal recoverin is acylated by a small family of fatty acids. *J. Biol. Chem.* 267, 16033-16036
- Dizhoor, A. M., Chen, C.-K., Olshevskaya, E., Sinelnikova, V. V., Phillipov, P. and Hurley, J. B. (1993). Role of the acylated amino terminus of recoverin in Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane interaction. *Science* 259, 829-832
- Dizhoor, A. M., Lowe, D. G., Olshevskaya, E. V., Laura, R. P. and Hurley, J. B. (1994). The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, RetGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator. *Neuron* 12, 1345-1352
- Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S. and Lyubarsky, A. L. (1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313, 310-313
- Frins, S., Bonigk, W., Muller, F., Kellner, R. and Koch, K.-W. (1996). Functional characterization of a guanylyl cyclase-activating protein from vertebrate rods. *J. Biol. Chem.* 271, 8022-8027
- Fukada, Y., Takao, T., Ohguro, H., Yoshizawa, T., Akino, T. and Shimonishi, Y. (1990). Farnesylated  $\gamma$ -subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature* 346, 658-660
- Fukada, Y., Matsuda, T., Kokame, K., Takao, T., Shimonishi, Y., Akino, T. and Yoshizawa, T. (1994). Effects of carboxyl methylation of photoreceptor G protein  $\gamma$ -subunit in visual transduction. *J. Biol. Chem.* 269, 5163-5170
- 深田吉孝 (1993). 視細胞における光受容体とGタンパク質の構造と機能. *生化学* 第65巻 第7号, pp.513-536
- 深田吉孝, 真田佳門 (1995). 光受容体の構造と機能調節. *実験医学増刊『GTP結合タンパク質』* Vol.14 No.2, pp.63-67
- Fung, B. K.-K., Hurley, J. B. and Stryer, L. (1981). Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 152-156
- Gorczyca, W. A., Gray-Keller, M. P., Detwiler, P. D. and Palczewski, K. (1994). Purification and physiological evaluation of a guanylate cyclase activating protein from retinal rods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 4014-4018
- Gorczyca, W. A., Polans, A. S., Surgucheva, I. G., Subbaraya, I., Baehr, W. and Palczewski, K. (1995). Guanylyl cyclase activating protein. *J. Biol. Chem.* 270, 1-8
- Goto, K., Yamagata, K. and Miki, N. (1990). Direct photosensitivity of chick pinealocytes as demonstrated by visinin. *Cell Tissue Res.* 262, 501-505

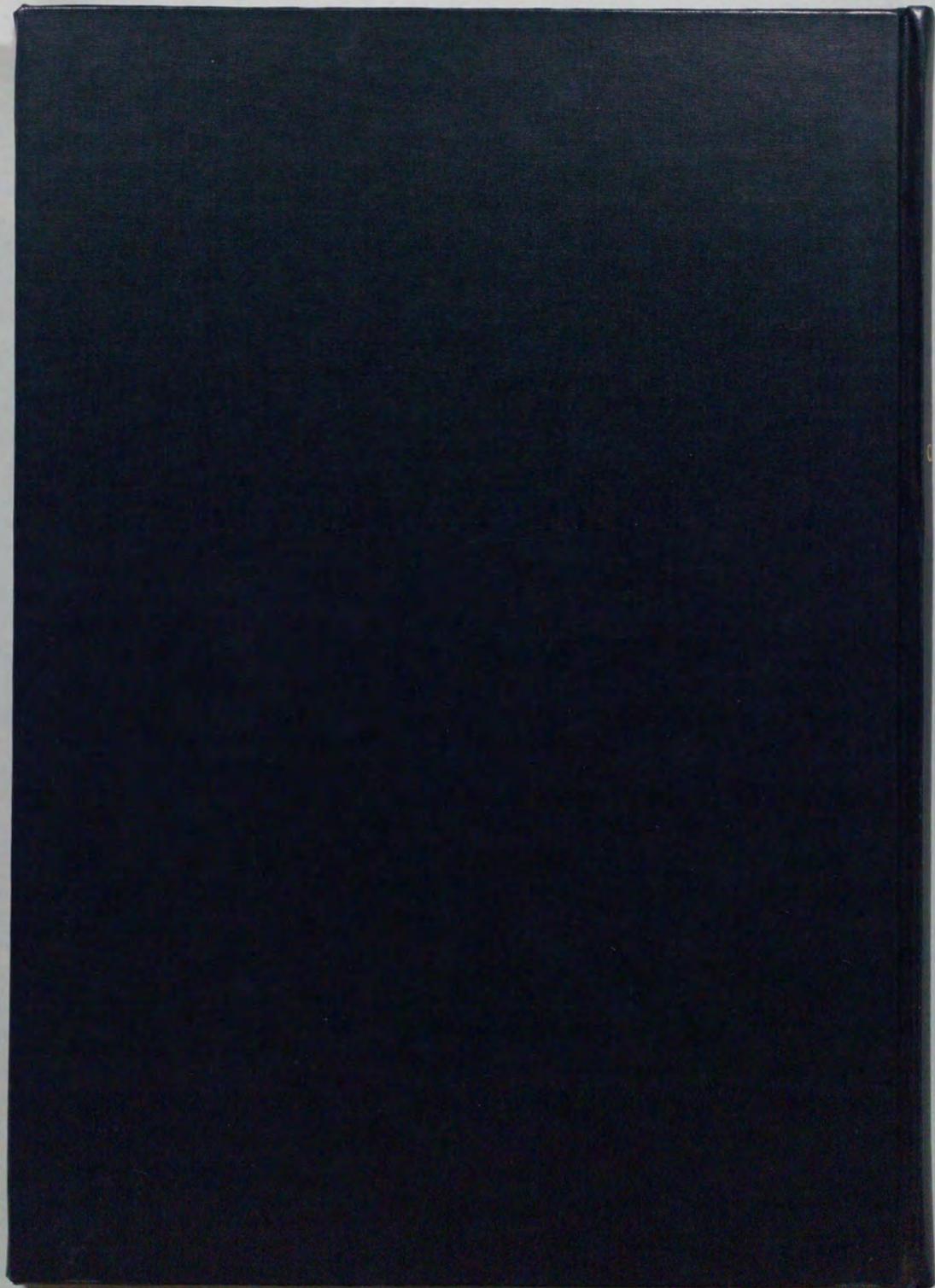
- Gray-Keller, M. P., Polans, A. S., Palczewski, K. and Detwiler, P. B. (1993). The effect of recoverin-like calcium-binding proteins on the photoresponse of retinal rods. *Neuron* 10, 523-531
- Haga, K. and Haga, T. (1990). Dual regulation by G proteins of agonist-dependent phosphorylation of muscarinic acetylcholine receptors. *FEBS Lett.* 268, 43-47
- Haga, K. and Haga, T. (1992). Activation by G protein  $\beta\gamma$  subunits of agonist- or light-dependent phosphorylation of muscarinic acetylcholine receptors and rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 266, 8835-8855
- Heuckeroth, R. O., Glaser, L. and Gordon J. I. (1988). Heteroatom-substituted fatty acid analogs as substrates for *N*-myristoyltransferase: an approach for studying both the enzymology and function of protein acylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 8795-8799
- Hughes, R. E., Brzovic, P. S., Klevit, R. E. and Hurley, J. B. (1995). Calcium-dependent solvation of the myristoyl group of recoverin. *Biochemistry* 34, 11410-11416
- Hurley, J. B., Dizhoor, A. M., Rat, S. and Stryer, L. (1993). Recoverin's role: conclusion withdrawn. *Science* 260, 740
- Inglese, J., Freedman, N. J., Koch, W. J. and Lefkowitz, R. J. (1993). Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* 268, 23735-23738
- Johnson, D. R., Bhatnagar, R. S., Knoll, L. J. and Gordon J. I. (1994). Genetic and biochemical studies of protein *N*-myristoylation. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 869-914
- Johnson, R. S., Ohguro, H., Palczewski, K., Hurley, J. B., Walsh, K. A. and Neubert, T. A. (1994). Heterogeneous *N*-acylation is a tissue- and species-specific posttranslational modification. *J. Biol. Chem.* 269, 21067-21071
- Kameyama, K., Haga, K., Haga, T., Kontani, K., Katada, T. and Fukada, Y. (1993). Activation by G protein  $\beta\gamma$  subunits of  $\beta$ -adrenergic and muscarinic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 268, 7753-7758
- Kawamura, S. and Bownds, M. D. (1981). Light-adaptation of the cyclic GMP phosphodiesterase of frog photoreceptor membranes mediated by ATP and calcium ions. *J. Gen. Physiol.*, 77, 571-591
- Kawamura, S. and Murakami, M. (1991). Calcium-dependent regulation of cyclic GMP phosphodiesterase by a protein from frog retinal rods. *Nature* 349, 420-423
- Kawamura, S., Takamatsu, K. and Kitamura, K. (1992a). Purification and characterization of S-modulin, a calcium-dependent regulator on cGMP phosphodiesterase in frog rod photoreceptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 411-417

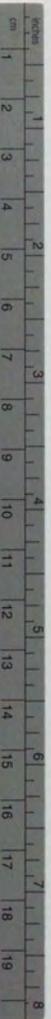
- Kawamura, S. (1992b). Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin. *Nature* 363, 855-857
- Kawamura, S., Hisatomi, O., Kayada, S., Tokunaga, F. and Kuo, C.-H. (1993). Recoverin has S-modulin activity. *J. Biol. Chem.* 268, 14579-14582
- Kawamura, S., Cox, J. A. and Nef, P. (1994). Inhibition of rhodopsin phosphorylation by non-myristoylated recombinant recoverin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 121-127
- Kawamura, S., Kuwata, O., Yamada, M., Matsuda, S., Hisatomi, O. and Tokunaga, F. (1996). Photoreceptor protein s26, a cone homologue of S-modulin in frog retina. *J. Biol. Chem.* 271, 21359-21364
- Kelleher, D. J. and Johnson, G. L. (1990). Characterization of rhodopsin kinase from bovine rod outer segment. *J. Biol. Chem.* 265, 2632-2639
- Kishore, N. S., Lu, T., Knoll, L. J., Katoh, A., Rudnick, D. A., Mehta, P. P., Devadas, B., Huhn, M., Atwood, J. L., Adams, S. P., Gokel, G. W. and Gordon, J. I. (1991). The substrate specificity of *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase. *J. Biol. Chem.* 266, 8835-8855
- Kobayashi, M., Takamatsu, K., Saitoh, S., Miura, M. and Noguchi, T. (1992). Molecular cloning of hippocalcin, a novel calcium-binding protein of the recoverin family exclusively expressed in hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 511-517
- Koch, K.-W. and Stryer, L. (1988). Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. *Nature* 334, 64-66
- Kokame, K., Fukada, Y., Yoshizawa, T., Takao, T. and Shimonishi, Y. (1992). Lipid modification at the N terminus of photoreceptor G-protein  $\alpha$ -subunit. *Nature* 359, 749-752
- Krebs, W. and Friedrich, I. (1988). in *The Structure of the Eye* (Hollyfield, J. G., ed.) pp.175-182, Elsevier, Amsterdam
- Kühn, H., Cook, J. H. and Dreyer, W. J. (1973) Phosphorylation of rhodopsin in bovine photoreceptor membranes. A dark reaction after illumination. *Biochemistry* 12, 2495-2502
- Kühn, H. (1978). Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. *Biochemistry* 17, 4389-4394
- Kuno, T., Kajimoto, Y., Hashimoto, T., Mukai, H., Shirai, Y., Saheki, S. and Tanaka, C. (1992). cDNA cloning of a neural visinin-like  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 1219-1225
- Kutuzov, M. A., Shmukler, B. E., Suslov, O. N., Dergachev, A. E., Zargarov, A. A. and Abdulaev, N. G. (1991). P26-calcium binding protein from bovine retinal photoreceptor cells. *FEBS Lett.*, 267, 21-24

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lambrecht, H.-G. and Koch, K.-W. (1991). A 26kD calcium binding protein from bovine rod outer segments as modulator of photoreceptor guanylate cyclase. *EMBO J.* 10, 793-798
- Lenz, S. E., Henschel, Y., Zopf, D., Voss, B. and Gundelfinger, E. D. (1992). VILIP, a cognate protein of the retinal calcium binding proteins visinin and recoverin, is expressed in the developing chicken brain. *Mol. Brain Res.* 15, 133-140
- Martell, A. E. and Smith, R. M. (1974). in *Critical Stability Constants*, Vol. 1, Plenum Publishing Corp., New York
- Matthews, H. R., Murphy, R. L. W., Fain, G. L. and Lamb, T. D. (1988). Photoreceptor light adaptation is mediated by cytoplasmic calcium concentration. *Nature* 334, 67-69
- McGinnis, J. F., Stepanik, P. L., Baehr, W., Subbaraya, I. and Lerioux, V. (1992). Cloning and sequencing of the 23 kDa mouse photoreceptor cell-specific protein. *FEBS Lett.* 302, 175-176
- McLaughlin, S. and Aderem, A. (1995). The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem. Sci.* 20, 272-276
- Nakatani, K. and Yau, K.-W. (1988). Calcium and light adaptation in retinal rods and cones. *Nature* 334, 69-71
- Neubert, T. A., Johnson, R. S., Hurley, J. B. and Walsh, K. A. (1992). The rod transducin  $\alpha$  subunit amino terminus is heterogeneously fatty acylated. *J. Biol. Chem.* 267, 18274-18277
- Ohguro, H., Palczewski, K., Ericsson, L. H., Walsh, K. A. and Johnson, R. S. (1993). Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites. *Biochemistry* 32, 5718-5724
- Palczewski, K., Buczylo, J., Hooser, P. V., Carr, S. A., Huddleston, M. J. and Crabb, J. W. (1992a). Identification of the autophosphorylation sites in rhodopsin kinase. *J. Biol. Chem.* 267, 18991-18998
- Palczewski, K., Rispoli, G. and Detwiler, P. B. (1992b). The influence of arrestin (48K protein) and rhodopsin kinase. *Neuron* 8, 117-126
- Palczewski, K., Subbaraya, I., Gorczyca, W. A., Helekar, B. S., Ruiz, C. C., Ohguro, H., Huang, J., Zhao, X., Crabb, J. W., Johnson, R. S., Walsh, K. A., Gray-Keller, M., P., Detwiler, P. B. and Baehr, W. (1994). Molecular cloning and characterization of retinal photoreceptor guanylyl cyclase-activating protein. *Neuron* 13, 395-404

- Peitzsch, R. M. and McLaughlin (1993). Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* 32, 10436-10443
- Pitcher, J. A., Inglese, J., Higgins, J. B., Arriza, J. L., Casey, P. J., Kim, C., Benovic, J. L., Kwatra, M. M., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992). Role of  $\beta\gamma$  subunits of G proteins in targeting the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 257, 1264-1267
- Polans, A. S., Buczylo, J., Crabb, J. and Palczewski, K. (1991). A photoreceptor calcium binding protein is recognized by autoantibodies obtained from patients with cancer-associated retinopathy. *J. Cell Biol.* 112, 981-989
- Polans, A. S., Crabb, J. and Palczewski, K. (1993). Calcium-binding proteins in the retina. *Methods in Neurosciences*, Vol. 15 (Hargrave, P. A., ed) pp. 248-260, Academic Press, New York
- Pongs, O., Lindemeiner, J., Zhu, X. R., Theil, T., Engelkamp, D., Krah-Jenygens, I., Lambrecht, H.-G., Koch, K. W., Schwemer, J., Rivosecchi, R., Mallart, A., Galceran, J., Canal, I., Barbas, J. A. and Ferrus, A. (1992). Frequentin-a novel calcium-binding protein that modulates synaptic nervous system. *Neuron* 11, 15-28
- Sanada, K. and Fukada, Y. (1995). Unique lipids and unique properties of retinal proteins. *Behavioral and Brain Sciences*, 18, 486-487
- Sanada, K., Kokame, K., Yoshizawa, T., Takao, T., Shimonishi, Y. and Fukada, Y. (1995). Role of heterogeneous N-terminal acylation of recoverin in rhodopsin phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270, 15459-15462
- Sanada, K., Shimizu, F., Kameyama, K., Haga, K., Haga, T. and Fukada, Y. (1996). Calcium-bound recoverin targets rhodopsin kinase to membranes to inhibit rhodopsin phosphorylation. *FEBS Lett.* 384, 15459-15462
- 真田佳門, 深田吉孝 (1996a). シグナル伝達蛋白質における脂質修飾の役割. 膜【膜脂質シグナルの最新動向】 Vol.21 No.3, pp.190-196
- 真田佳門, 深田吉孝 (1996b). 三量体G蛋白質の脂質による修飾と機能調節. 実験医学増刊【脂質研究の新展開】 Vol.14 No.14, pp.193-199
- Shouno, O., Kokame, K., Araki, M., Takao, T., Shimonishi, Y., Murata, M., Yoshizawa, T. and Fukada, Y. (1996). Preparation and characterization of monoclonal antibodies specific for lauroylated isoform of bovine transducin  $\alpha$ -subunit: Immunohistochemical analysis of bovine retinas. *J. Neurochem.* 66, 2188-2196
- Sitaramayya, A. (1986). Rhodopsin kinase prepared from bovine rod disk membranes quenches light activation of cGMP phosphodiesterase in a reconstituted system. *Biochemistry* 25, 5460-5468
- Stepanik, P. L., Lerious, V. and McGinnis, J. F. (1993). Developmental appearance, species and tissue specificity of mouse 23-kDa, a retinal calcium-binding protein (recoverin). *Exp. Eye Res.* 57, 189-197

- 洲崎敏伸 (1987). Ca-EGTA緩衝液における遊離カルシウムイオン濃度を計算するためのプログラム. 動物生理 Vol.4 No.1, pp.19-24
- Takamatsu, K., Kitamura, K. and Noguchi, T. (1992). Isolation and characterization of recoverin-like  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 245-251
- Tanaka, T., Ames, J. B., Harvey, T. S., Stryer, L. and Ikura, M. (1995). Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state. *Nature* 376, 444-447
- Terasawa, M., Nakano, A., Kobayashi, R. and Hidaka, H. (1992). Neurocalcin: a novel calcium-binding protein from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 267, 19596-19599
- Towler, D. A., Gordon, J. I., Adams, S. P. and Glaser, L. (1988). The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 69-99
- Tsien, R. and Pozzan, T. (1989). Measurement of cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  with quin2. *Methods Enzymol.* 172, 230-262
- Yamagata, K., Goto, K., Kuo, C.-H., Kondo, H. and Miki, N. (1990). Visinin: a novel calcium binding protein in retinal cone cells. *Neuron*, 302, 469-476
- Yau, K.-W. and Nakatani, K. (1985). Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment. *Nature* 313, 579-582
- Zozulya, S. and Stryer, L. (1992). Calcium-myristoyl protein switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 89, 11569-11573





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

