

## 総 説

# ロドプシンの磷酸化脱磷酸化の生理的意義と疾病との関係

大 黒 浩

札幌医科大学医学部眼科学教室

### 要 約

脊椎動物視細胞は、外界からの光信号を視覚に変換するために働く生物感受器である。その機能には、①光刺激を電気信号に変換する(視興奮)、②次の光刺激に備えて視興奮を直ちに停止する(視興奮の停止)、③外部の光環境に応じて視興奮の感度を調節する(順応)、の3つがある。これらの3つの異なった生物機能は、外節の光受容体であるロドプシン(桿体)を中心とする沢山の視興奮関連蛋白から成るネットワークにより統制されている。その中で可逆反応である磷酸化および脱磷酸化がロドプシンの異なった部位で起こることにより、視興奮の停止機

構と順応を制御していることが示された。また、遺伝性の網膜変性疾患である網膜色素変性の病因の1つとしてロドプシンの mutation が考えられているが、その中でレチナールを結合できない mutant では、ロドプシンは磷酸化されないことも併わせて明らかとなった。(日眼会誌 100:575-581, 1996)

キーワード：視興奮、ロドプシン、順応、磷酸化および脱磷酸化、網膜色素変性

## A Review

### Physiological Roles of Rhodopsin Phosphorylation and Dephosphorylation and its Relationship with Retinitis Pigmentosa

Hiroshi Oguro

Department of Ophthalmology, Sapporo Medical University School of Medicine

#### Abstract

Light signals are converted into electrical signals by vertebrate photoreceptor cells, and the generated electrical signals are then modulated within retinal neurons and brain. During the visual transduction processes in the photoreceptor cells, there are basically three functions. That is, ① photoexcitation, ② quenching of the photoexcitation, and ③ adaptation. These functions are precisely regulated by enzymatic cascade reactions. Quite recently, it was shown that rhodopsin phosphorylation occurred at different sites with different kinetics, *in vivo*, and this may be a control mechanism for both quenching and adaptation. Furthermore, autosomal retinitis pigmentosa (RP) with

rhodopsin mutation at 296 Lys, which in the binding site of 11-*cis*-retinal, showed constitutive activation of guanosine 5'-triphosphate (GTP) binding protein and no rhodopsin phosphorylation by rhodopsin kinase. These observations suggest that rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation are critical for understanding visual transduction and pathophysiology of RP. (J Jpn Ophthalmol Soc 100:575-581, 1996)

Key words: Photoexcitation, Rhodopsin, Adaptation, Phosphorylation and dephosphorylation, Retinitis pigmentosa

## I 緒 言

脊椎動物の視細胞には強い光のもとで作動し色覚に関

与する椎体と、弱い光のもとで暗明視に関与する桿体がある。ヒトの錐体には3種類の錐体および桿体の併せて4種類の視細胞により、およそ380~780 nmの波長の範

別刷請求先：060 北海道札幌市中央区南1条西16丁目 札幌医科大学医学部眼科学教室 大黒 浩  
(平成7年8月19日受付,平成8年3月23日改訂受理)

Reprint requests: Hiroshi Ohguro, M.D. Department of Ophthalmology, Sapporo Medical University School of Medicine, S-1 W-16, Chuo-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060, Japan

(Received August 19, 1995 and accepted in revised form March 23, 1996)

困の光を感知できる。我々の持つ視覚が様々な色を識別したり、薄暗い所で僅かな光を感知できるのは、これら4種類の視細胞が敏感に反応しているためである。

脊椎動物の視細胞の役割は、大きく次の3つに分けられる。①光刺激に敏感に感知し電気信号に変換する(視興奮)、②目まぐるしく変化する外部の光情報に対応するために視興奮を直ちに停止し、次の光刺激に備える(視興奮の停止)、③外部の光環境に対応し、視興奮の感度を調節する(順応)。このうち、①視興奮と②その停止機構の分子機構に関しては、ほぼ現在までに明らかとなっている<sup>1)~6)</sup>。すなわち、視細胞桿体外節円板膜上に存在する光受容蛋白質ロドプシンに光が当たると、活性型の褪色中間体に変化する。次に、これがG結合蛋白質、ホスホジェステラーゼを次々に活性化させると細胞質中の adenosine 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP)濃度が急減し、形質膜上のcGMP依存性チャンネルが閉鎖する(視興奮電位の発生)。一方、視興奮の停止は、ロドプシンキナーゼ(RK)、またはプロテインキナーゼC(PKC)により磷酸化されたロドプシン褪色中間体

がアレスチン(48k蛋白質、またはS抗原とも呼ばれる)と結合するに伴いG蛋白質との共役が断たれることにより成立する。これらの分子機構は単に視細胞における視興奮のものではなく、広くホルモンや神経系の細胞内情報伝達機構と共通であることがわかっている。最近、著者ら<sup>7)</sup>のグループは、ロドプシンの磷酸化が視興奮の停止だけでなく、視細胞の順応の分子機構にも関与するという事実を見出した。また、ロドプシン遺伝子の異常が原因である網膜色素変性の一部において、ロドプシンの磷酸化の異常が細胞死を早めるという興味深い結果<sup>8)</sup>も併せて発見した。そこで本総説では、ロドプシンの磷酸化が視細胞の生理機能をどのように制御しているかを最新の知見に基づいて解説する。

## II ロドプシンの磷酸化脱磷酸化

### 1. ロドプシンの構造(図1)

視細胞桿体の光受容体であるロドプシンは、発色団にレチナールをもつ色素蛋白質である。ウシロドプシンは分子量39kで、アミノ酸348残基から構成されている。

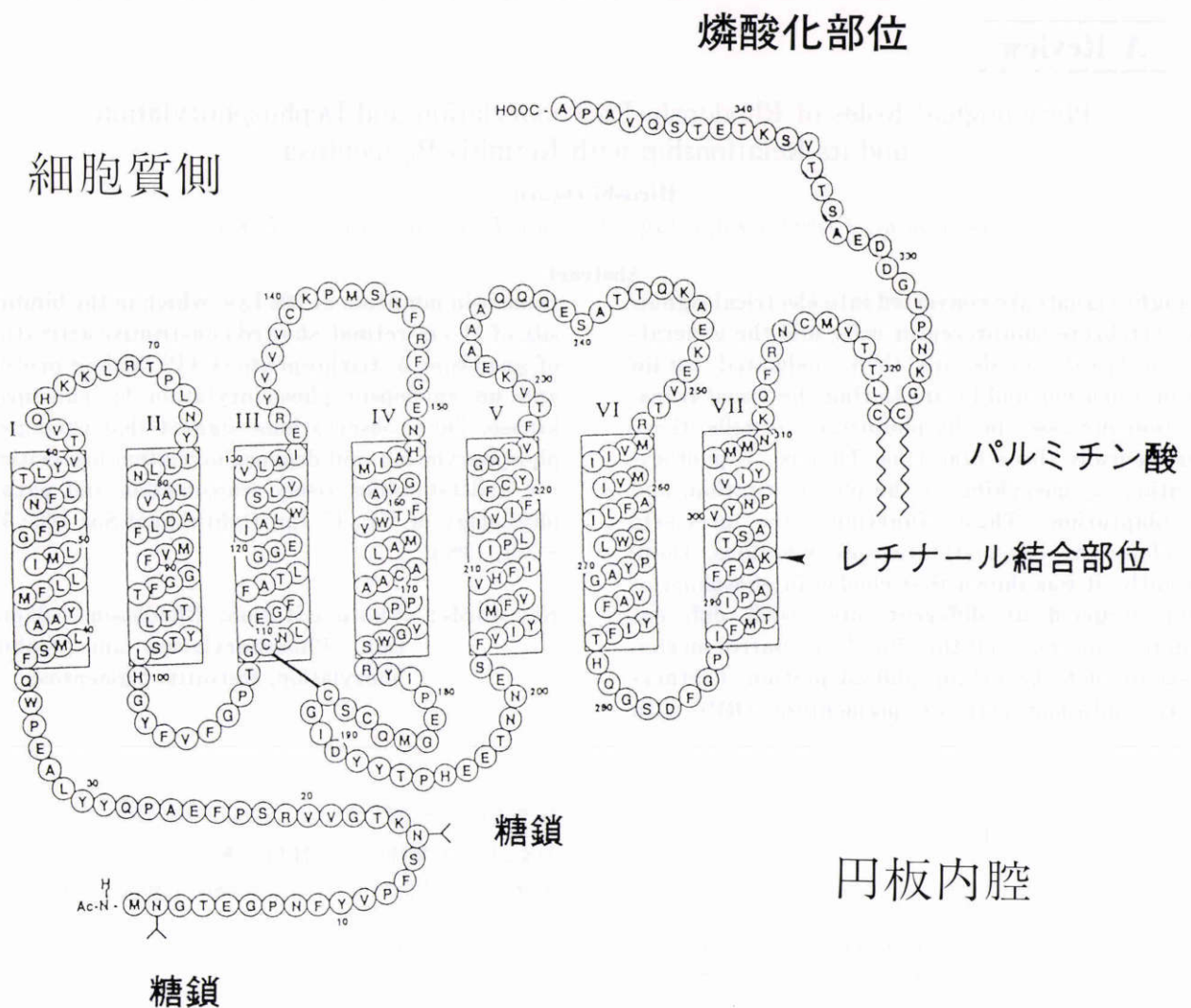


図1 ウシロドプシンの構造と翻訳後修飾。  
Hargrave and McDowell の総説(文献6)の図を改変した。

さらに、二次構造の推定と疎水性度の解析から、ロドプシンのもつ7本の $\alpha$ ヘリックス構造がいずれも膜を貫通する構造であることが推定されている<sup>4)6)</sup>。Nathansら<sup>9)</sup>がヒトの色覚色素視物質の一次構造を決定したのを始め、各種の視物質が分子生物学的手法により次々に決定された。これら視物質の構造は、 $\beta$ アドレナリン性受容体またはムスカリン性受容体のそれと極めて類似の構造で、数百以上ある guanosine 5'-triphosphate (GTP) 結合蛋白質共役受容体の基本構造である。ロドプシンのN末端部分は円板内腔へ、C末端部分は細胞質へ突出している。ロドプシン分子には様々な翻訳後修飾が認められる<sup>6)</sup>。すなわち、N末端のMet残基はアセチル化され、2番と15番のGln残基には糖鎖が結合している。110番と187番のCys残基とは、分子内s-s結合でつながれている。膜貫通部分に存在する296番目のLys残基に11-シスレチナルがシッフ塩基結合している。313番および314番のCys残基にはパルミチン酸が結合し、この部分が膜と接着しているものと考えられている。興味深いことにロドプシン以外の視興奮関連蛋白質、G蛋白質<sup>10)~14)</sup>、ホスホジェステラーゼ<sup>15)16)</sup>、ロドプシンキナーゼ<sup>17)</sup>、guanylate cyclase activating protein (GCAP)<sup>18)</sup>、p26<sup>19)</sup>などにも疎水性の翻訳後修飾が見出されている。C末端のセリンおよびスレオニン残基はロドプシンキナーゼにより磷酸化される<sup>20)</sup>。

## 2. ロドプシンの磷酸化および脱磷酸化

視細胞桿体外節中には沢山の蛋白質が光感受性に磷酸化または脱磷酸化されている<sup>21)</sup>が、その中で最も詳細に研究されているのがロドプシンの磷酸化である。1970年代前半に3つの研究グループがほぼ同時に、視細胞桿体視物質ロドプシンが光感受性に磷酸化されることを見出した<sup>22)~24)</sup>。Kuhn<sup>25)</sup>は<sup>32</sup>Pでラベルされた磷酸を体内に投与したカエルを用いて *in vivo* で光依存的にロドプシンの磷酸化および脱磷酸化が起こっていることを証明した。その後の生化学的研究により、光褪色したロドプシン1分子当たり最高7~9分子もの磷酸基が導入されることが明らかにされた<sup>26)27)</sup>。ロドプシン磷酸化の生理的意義として、磷酸化されたロドプシンにアレスチンが結合する<sup>28)</sup>と、G蛋白質の活性化を競合的に抑制する(アレスチン分子の多くの部位が磷酸化されたロドプシン褪色中間体の細胞質側に強固に結合する<sup>29)</sup>)ことから、これが視細胞の視興奮の不活性化機構に関与しているものと考えられている。最近、我々の研究グループ<sup>30)</sup>は、磷酸化していないロドプシン褪色中間体に結合するアレスチンの splice variant である p44 を発見し、ロドプシンの磷酸化を必要としない不活性化機構が存在することを明らかにした。次に、磷酸化ロドプシン褪色中間体/アレスチン複合体からレチノールデヒドロゲナーゼの働きにより、オールトランスレチナルが引き抜かれると同時にアレスチンと磷酸化ロドプシンに分けられる。磷酸化ロドプシン

は蛋白質フォスファターゼ2Aにより脱磷酸化された<sup>31)</sup>のち、11-シスレチナルと結合しロドプシンに再生される<sup>32)</sup>。また、パッチクランプ法など電気生理学的手法を用い、単離した視細胞桿体外節膜電位をATP(アデノシン3磷酸)ありなしで測定したところ、ロドプシンの磷酸化が視興奮の停止に深く関係していることも併せて判明した<sup>33)</sup>。さらに、最近遺伝子操作によりC末端の磷酸化部位を取り除いたロドプシンを持つマウス(トランスジェニックマウス)で視細胞興奮の回復が著しく遅延したことから、ロドプシンの磷酸化が本当に視興奮の停止に必須であることが証明された<sup>34)</sup>。

## 3. ロドプシンキナーゼ(RK)と蛋白質キナーゼC(PKC)

ロドプシンの磷酸化を触媒とする酵素として、RKとPKCが現在までに報告されている。RKは、当初精製が進むとともに活性が著しく低下するために、その分子量、アミノ酸配列など蛋白質化学的性質は不明であった。Palczewski<sup>35)</sup>は detergent である tween 80 を用いることにより、homogeneous で活性の高いRKを得ることに成功した。その後、RKはセリン/スレオニンキナーゼで、分子量6万3千のポリペプチドであることがわかった。RKはそれぞれ構造上、ロドプシンとの結合を制御するN-末端ドメイン、触媒ドメイン、自己磷酸化部位およびファルネシル化Cys残基を含むC-末端ドメインから成ることがわかっている<sup>17)</sup>。我々のグループは、RKの自己磷酸化部位のアミノ酸残基を置換した mutant を用い、ロドプシンの磷酸化部位がこの部位のアミノ酸によって変化する結果を得たこと<sup>36)</sup>や、RKの自己磷酸化によりRKと膜との結合性が変化すること<sup>37)</sup>から、RKの自己磷酸化はRKの生物活性を制御しているものと推定した。一方、PKCは分子量が約80kで、細胞内にCaイオンが導入されることに伴い細胞内で増加するジアシルグリセロール(DG)により活性化され、光感受性にロドプシンを磷酸化する<sup>38)39)</sup>。しかし、光受容後、視細胞桿体外節中のCaイオンは低下することから、PKCがロドプシンをどのように磷酸化し、光によりどのような制御を受けるのか曖昧であることから、PKCによるロドプシン磷酸化の存在に疑問視する意見も少なくない。

## 4. ロドプシンの磷酸化数と部位

ロドプシン1分子当たりの磷酸化数は、1~9個と報告により様々である。Findlayら<sup>40)</sup>は、ロドプシンの磷酸化部位を直接決定するためにトリプシンおよびV8プロテアーゼを用いた酵素消化とアミノ酸分析およびアミノ酸配列分析により、C末端近傍のセリン(334, 338, 343)およびスレオニン(335, 336)が磷酸化すると報告した。しかし、ロドプシンの磷酸化数と機能の関係については議論が分かれていた。それはロドプシンが光感受性磷酸化を検討する際、平均の磷酸化数と機能との関係について検討されていたものの、磷酸化部位と機能との関係につ

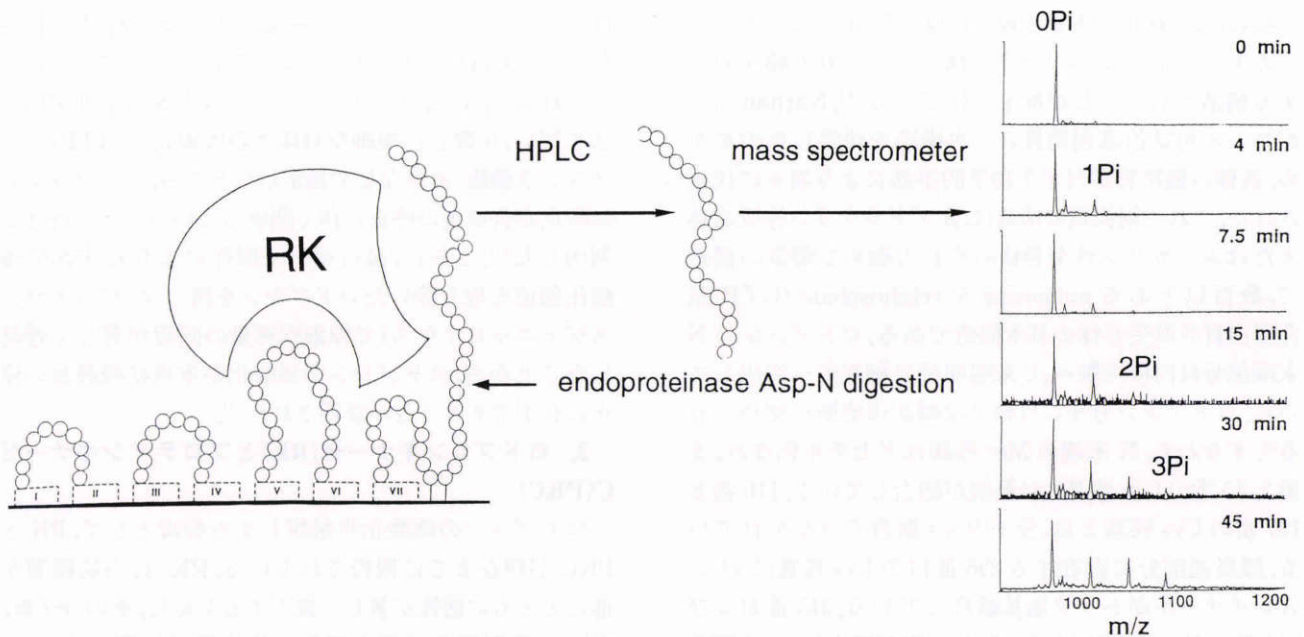


図2 ロドプシンの磷酸化部位の決定法。

ロドプシンキナーゼ(RK)により磷酸化された光褪色ロドプシンのすべての可能な磷酸化部位を含んだC末端ペプチド(330 DDEASTTVSKTETSQVAPA)を, endoproteinase Asp-N で切断したものをC18逆層カラムを装着した high pressure liquid chromatography (HPLC) で精製した. 得られたペプチドの磷酸化数を質量分析(Mass Spectrometry)で検討した. この図では時間経過により磷酸化が進んでいることがわかる. OPi, 1 Pi, 2 Pi, 3 Pi はそれぞれロドプシンC末端ペプチドに0, 1, 2, 3分子磷酸が結合していることを示している. Ohguro ら<sup>42)</sup>の図を基に作成した.

いてはそれを精密に検討する方法が確立していなかったため不明であった. そこで著者は, ロドプシンの磷酸化数および磷酸化部位と機能の関係を明らかにするために, 分離精製した視細胞桿体外節膜(ROS)にATPを加え, 異なった時間光照射することで平均磷酸化数の異なるサンプルを調整した. Palczewski ら<sup>41)</sup>の方法に従ってサンプルを endoproteinase Asp-N で特異的にすべての磷酸化が可能な部位を含んだロドプシンのC末端19アミノ酸(330 DDEASTTVSKTETSQVAPA)で切断し, 逆相 high pressure liquid chromatography (HPLC) カラムでロドプシンC末端ペプチドを精製した. エレクトロスプレイマススペクトロメーター(ES/MS)による分析で磷酸化数の異なった分子を確認することに成功した(図2). 次に, 磷酸化部位を直接同定するためにロドプシンC末端ペプチドを, さらに消化酵素で切断したものをES/MSおよびタンデムマススペクトロメトリー(MS/MS)分析を行った. その結果, ロドプシンは時間経過とともに338 Ser, 343 Ser, 336 Thrの順に磷酸化されることがわかった<sup>42)</sup>. これとほぼ同時期に, 他の3グループ<sup>43)~45)</sup>も類似の方法でロドプシンの磷酸化部位を決定している.

##### 5. ロドプシンの磷酸化を制御する機構

次に, 著者ら<sup>46)</sup>のグループは, 上記の方法を用いて視細胞桿体外節内でロドプシンの磷酸化数と部位を制御する機構の検討を行った. 先に示したロドプシンの光褪色と

再生のサイクルの中でロドプシンの磷酸化に影響を与える因子として, a) アレスチンとの結合, b) レチノールデヒドロゲナーゼによるロドプシン褪色中間体の代謝の2つの反応段階で, 磷酸化が1分子当たり最高3か所までしか進まないことがわかった. したがって, 以前1分子当たり7~9か所磷酸化されるという報告は生化学操作に伴う artefact によることが示唆された.

##### 6. *In vivo*でのロドプシン磷酸化および脱磷酸化

生体内でロドプシンは光刺激に応じてどの部位が, また1分子当たりどの程度磷酸化され, またどのようにして脱磷酸化されるのだろうか. 生化学を得意とする者にとって生化学反応を直接観察することは現時点でほとんど不可能な問題であるが, この究極の生体内における磷酸化および脱磷酸化反応を検討するために, 著者ら<sup>7)</sup>はマウス1万匹を用いて検討を行った. 方法は, 異なった光環境下に順応させたマウスを頸椎脱臼により犠牲にした直後, 眼球を摘出切開した後, 網膜をRKおよびフォスファターゼ阻害剤を含んだ溶液中で voltex mixer で30分間攪拌した. 次に, スクロース勾配遠心法により円板膜を分離し, 酵素消化で得られたロドプシンC末端ペプチドをヘptaフルオロ酢酸存在下でHPLCカラムで精製することにより, 多磷酸化, 単磷酸化および非磷酸化ペプチドを完全に分離した<sup>47)</sup>. 表1に示すように, 暗順応させたマウスからは非磷酸化ロドプシンのみが検出された. フラッシュまたは白熱灯(30分間)による光刺激を加

表 1 *In vivo* でのロドプシンの磷酸化と脱磷酸化<sup>7)</sup>

光条件	磷酸化ロドプシン		非磷酸化 ロドプシン (%)
	<sup>334</sup> Ser	<sup>338</sup> Ser	
dark	0	0	100
flash (500 fc)	7.3	4.5	88.2
flash (3 times)	10.6	6.2	83.2
32 fc	6.1	8.0	85.9
2,000 fc	8.4	13.0	78.6
2,000 fc/10 min dark	2.0	11.0	87.0
2,000 fc/10 min dark/flash (3 times)	9.4	16.3	74.3

各磷酸化および非磷酸化ロドプシンの割合 (%) は、本文中に示したように HPLC 精製したロドプシン C 末端ペプチドの量比から決定された。fc はフットカンデラの略で光量を示す

えたものでは、非磷酸化ペプチドに加え 2 種類の単磷酸化ペプチド(磷酸化部位は質量分析, トリプシンによる感受性および合成ペプチドとの比較から, それぞれ 334 Ser または 338 Ser であった)が検出された。両部位の磷酸化とも光強度に比例して磷酸化量が増加した。しかし, フラッシュ刺激と白熱灯 (30 分間) による光刺激では, 2 種類の単磷酸化ペプチドの比率が異なっていた(フラッシュ刺激および白熱灯では, それぞれ 338 Ser および 334 Ser が優位であった)。白熱灯刺激後 10 分間暗順応させたマウスでは, 338 Ser が 334 Ser よりも先に脱磷酸化された。白熱灯刺激後 10 分間暗順応させたのち, 再びフラッシュ (3 回) 刺激すると両部位とも磷酸化が増加した。したがって, ロドプシンの磷酸化の光依存性は極めて厳密であった。次に, 脱磷酸化の時間経過の様子を検討した。フラッシュまたは白熱灯 (30 分間) による光刺激後暗順応させた時, 338 Ser 部位は 20~30 分以内で完全に脱磷酸化されたのに対し, 334 Ser の脱磷酸化は 60 分間暗順応させても完全ではなかった。特に, 334 Ser の脱磷酸化の時間経過はロドプシン褪色中間体からロドプシンへの再生のそれと一致した。したがって, ロドプシンの磷酸化は 2 つの異なった生理機能 (338 Ser の磷酸化: 視興奮の停止, 334 Ser の磷酸化: 暗順応) を制御していることが示唆された。さらに, 磷酸化されたロドプシン褪色中間体を特異的に認識する抗体で脱磷酸化の様子を検討したところ, 視細胞桿体外節の基底部が先端部より先に脱磷酸化されることも併せて明らかとなった<sup>7)</sup>。これは, Hodgikin ら<sup>48)</sup>が照射後視細胞桿体外節先端部が基底部より感受性の回復が有意に遅いという結果と一致する。したがって, 以上の研究結果から, 著者は図 3 に示す機構を考えている。暗の中ではロドプシンは磷酸化されていないので, 視細胞桿体外節全体が光刺激に対して感受性を持ち感度が最も高い。フラッシュ刺激(図 3 A)により視細胞外節のほとんどが磷酸化されると, 残ったわずかな部位のみ光刺激に対して感受性を持つので感度が低い。次に, 再び暗中に移動し視細胞外節の基底部より脱

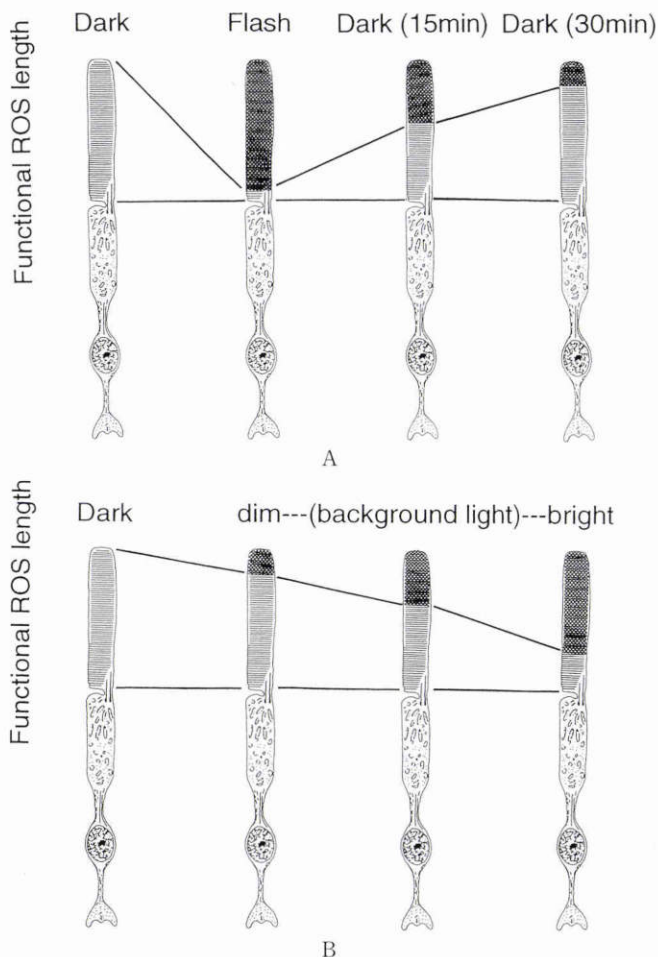


図 3 ロドプシンの磷酸化による視興奮感度の調節(順応)。

暗の中ではロドプシンは磷酸化されていないので, 外節すべてが光に感受性である(最も感度が低い)。A) フラッシュ刺激: 直後は殆どすべての外節中のロドプシンが磷酸化されているので, 光感受性部分がわずかしかない(最も感度が低い)。暗順応とともに脱磷酸化が進行するとともに光感受性部分が拡大する(感度がだんだん高くなる)。B) 背景光: 背景光の強度に比例してロドプシンの磷酸化の度合が異なるため, 感度が調節されている。

ROS: 視細胞桿体外節膜

酸化が進行すると, 光刺激に対して感受性を持つ部位もこれに従って増加するため, 感度が次第に高くなる。この仮説は, 我々が昼間映画館のような暗い所へ入った時, 眼が暗い所に慣れる様子(すなわち暗順応)をうまく説明できる。また, さらに視細胞レベルにおいて背景光と視感度の関係(明順応, 図 3 B)についても同様に, 背景光の強さに伴い視細胞外節の磷酸化された部位が変化することにより光感受性が制御されているものと考えられる。しかし, ロドプシンの 2 つの反応速度が異なる磷酸化がどのような分子機構によりもたらされるかは今後の研究課題であり, 現在検討中である。

7. ロドプシンの磷酸化と網膜色素変性

網膜色素変性は遺伝性進行性の変性疾患で, その病因

は不明で根本的な治療法はない。最近の分子生物学的研究により、病因の一部にロドプシンの mutation が発見 (現在までにロドプシン分子中数十か所以上) され注目されている<sup>49)</sup>。しかし、現在までに発見された mutation から予測されるロドプシン機能異常と病因の関係が明らかになっているものはほんのわずかである。その例として、レチナルの結合部位である 296 Lys 残基が mutation を起こし (発現した患者は重症の RP を示す)、レチナルと結合できなくなると、常にトランスデューシンを活性化し続けるために視細胞が燃え尽きてしまうと考えられている。著者ら<sup>8)</sup>は、この type の mutant の磷酸化を検討したところ、磷酸化が全く起こらないことがわかり、このこと (視興奮が停止されない) が一層視細胞の活性化、延いては細胞死に拍車をかけるものと考えられた。現在、他の mutation についても検討中である。

### III ま と め

視細胞において直接の光受容体物質ロドプシンは巧妙に統制された生体化学反応により、光感受性に活性化 (スイッチ on) または不活性化 (スイッチ off) される。ロドプシンの生物活性のスイッチの切り替えは、生体可逆反応である磷酸化および脱磷酸化によるものである。これ以外に、ロドプシンの磷酸化はさらにロドプシンの異なった部位に起こった磷酸化によって順応機構も制御していることがほぼ明らかとなった。一方で、磷酸化が起こらないようなロドプシンの遺伝子異常が網膜色素変性を引き起こす要因であることも強く示唆された。

### 文 献

- 1) 大黒 浩, 秋野豊明: 光情報の細胞内伝達機構の生化学. 細胞 22: 137-140, 1990.
- 2) 大黒 浩, 秋野豊明: 光の受容と伝達. 遺伝 45: 19-24, 1991.
- 3) 大黒 浩: 視細胞における光情報変換および制御機構. 神経眼科 11: 308-310, 1994.
- 4) 大黒 浩, 秋野豊明: 視細胞における情報. 若倉雅登 (編): 眼科 New insight ① 視覚情報処理. メヂカルビュー社, 東京, 10-20, 1994.
- 5) Lagnado L, Baylor D: Signal flow in visual transduction. Neuron 8: 995-1002, 1992.
- 6) Hargrave PA, McDowell JH: Regulation of visual transduction. Regulation of cell signal transduction pathway by desensitization and amplification. In: Sibley DR, et al (Eds): John Wiley & Sons Ltd. 25-67, 1994.
- 7) Ohguro H, Van Hooser JP, Milam AH, Palczewski K: Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation *in vivo*. J Biol Chem 270: 14259-14262, 1995.
- 8) Robinson PR, Buczylo J, Ohguro H, Palczewski K: Opsins with mutations at the sites of chromophore attachment constitutively active transducin but are not phosphorylated by rhodopsin kinase. Proc Natl Acad Sci USA 91: 5411-

- 5415, 1994.
- 9) Nathans J, Thomas D, Hogness DS: Molecular genetics of human color vision: The genes encoding blue, green and red pigments. Science 232: 193-202, 1986.
- 10) Fukada Y, Takao T, Ohguro H, Yoshizawa T, Akino T, Shimonishi Y: Farnesylated  $\gamma$ -subunit of photoreceptor G-protein is indispensable for GTP-binding. Nature 346: 658-660, 1990.
- 11) Ohguro H, Fukada Y, Takao T, Shimonishi Y, Yoshizawa T, Akino T: Carboxyl methylation and farnesylation of transducin  $\gamma$ -subunit synergistically enhance its coupling with metarhodopsin II. EMBO J 10: 3669-3674, 1991.
- 12) Neubert TA, Johnson RS, Hurley JB, Walsh KA: The rod transducin alpha subunit amino acid terminus is heterogeneously fatty acylated. J Biol Chem 269: 21067-21071, 1992.
- 13) Johnson RS, Ohguro H, Palczewski K, Hurley JB, Walsh KA, Neubert TA: Heterogeneous N-acylation is a tissue- and species-specific post-translational modification. J Biol Chem 269: 21067-21071, 1994.
- 14) Kokame K, Fukada Y, Yoshizawa T, Takao T, Shimonishi Y: Lipid modification at the N terminus of photoreceptor G-protein  $\alpha$  subunit. Nature 359: 749-752, 1992.
- 15) Ovchinnikov YA, Gubanov VV, Khramtsov NV, Ischenko KA, Zagranichny VE, Muradov TA, et al: Cyclic GMP phosphodiesterase from bovine retina: Amino acid sequence of the  $\alpha$ -subunit and nucleotide sequence of the corresponding cDNA. FEBS Lett 223: 169-173, 1987.
- 16) Bowes C, Li T, Danciger M, Baxter LC, Applebury ML: Retinal degeneration in rd mouse is caused by the  $\beta$  subunit of cGMP-phosphodiesterase. Nature 347: 677-680, 1990.
- 17) Lorenz W, Inglese J, Palczewski K, Onorato JJ, Caron MG, Lefkowitz RJ: The receptor kinase family: Primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase. Proc Natl Acad Sci USA 88: 8715-8719, 1991.
- 18) Palczewski K, Subbaraya I, Gaorczyca WA, Helekar BS, Ruiz CC, Ohguro H, et al: Molecular cloning and characterization of retinal photoreceptor guanylylcyclase-activating protein. Neuron 13: 395-404, 1994.
- 19) Dizhoor AM, Ericsson LH, Johnson RS, Kumar S, Olshevskaya E, Zozulya S, et al: The NH2 terminus of retinal recoverin is acylated by a small family of fatty acids. J Biol Chem 267: 16033-16036, 1992.
- 20) Palczewski K, Benovic JL: G-protein-coupled receptor kinases. Trends Biol Sci 16: 387-391, 1991.
- 21) 大黒 浩, 深田吉孝, 相馬 仁, 中川 喬, 秋野豊明: 光感受性に脱リン酸化される視細胞外節に存在する

- リン酸化蛋白質. 日眼会誌 97: 11—16, 1993.
- 22) **Kuhn H, Dreyer WJ**: Light dependent phosphorylation of rhodopsin by ATP. FEBS Lett 20: 1—6, 1972.
  - 23) **Bownds MD, Dawes J, Miller J, Stahlman M**: Phosphorylation of frog photoreceptor membrane induced by light. Nat New Biol 237: 125—127, 1972.
  - 24) **Frank RN, Cavanagh HD, Kenyon KR**: Light stimulated phosphorylation of bovine visual pigments by adenosine triphosphate. J Biol Chem 248: 596—609, 1973.
  - 25) **Kuhn H**: Light-dependent phosphorylation of rhodopsin in living frogs. Nature 250: 588—590, 1974.
  - 26) **Aton BR, Litman JJ, Jackson ML**: Isolation and identification of the phosphorylated species of rhodopsin. Biochemistry 23: 1737—1741, 1984.
  - 27) **Wilden U, Kuhn H**: Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: Number of phosphorylation sites. Biochemistry 21: 3014—3022, 1982.
  - 28) **Kuhn H, Hall DW, Wilden U**: Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membrane is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. FEBS Lett 176: 473—478, 1984.
  - 29) **Ohguro H, Palczewski K, Walsh KA, Johnson RS**: Topographic study of arrestin using differential chemical modifications and hydrogen/deuterium exchange. Prot Sci 3: 2428—2434, 1994.
  - 30) **Palczewski K, Buczylo J, Ohguro H, Annan RA, Carr SA, Crabb JW, et al**: Characterization of truncated form of arrestin isolated from bovine rod outer segments. Prot Sci 3: 314—324, 1994.
  - 31) **Fowles C, Akhtar M**: Interplay of phosphorylation and dephosphorylation in vision: Protein phosphatase of bovine rod outer segments. Biochemistry 28: 9385—9391, 1989.
  - 32) **Hofmann KP, Pulvermuller A, Buczylo J, Van Hooser JP, Palczewski K**: The role of arrestin and retinoids in the regeneration pathway of rhodopsin. J Biol Chem 267: 15701—15706, 1992.
  - 33) **Yau K-W, Nakatani K**: Light-suppressive, cyclic GMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment. Nature 317: 252—255, 1985.
  - 34) **Chen J, Makino CL, Peachey NS, Baylor DA, Simon MI**: Mechanism of rhodopsin inactivation *in vivo* as revealed by COOH-terminal truncation mutant. Science 267: 374—377, 1995.
  - 35) **Palczewski K**: Purification of rhodopsin kinase from rod outer segments. Methods Neurosci 15: 217—225, 1993.
  - 36) **Palczewski K, Ohguro H, Premont RT, Inglese J**: Rhodopsin kinase autophosphorylation. Characterization of site-specific mutations. J Biol Chem 270: 15294—15298, 1995.
  - 37) **Pulvermuller A, Palczewski K, Hofmann KP**: Interaction between photoactivated rhodopsin and its kinase: Stability and kinetics of complex formation. Biochemistry 32: 14082—14088, 1993.
  - 38) **Kelleher DJ, Johnson GL**: Phosphorylation of rhodopsin by protein kinase C *in vitro*. J Biol Chem 261: 4749—4757, 1986.
  - 39) **Newton AC, Williams DS**: Involvement of protein kinase C in the phosphorylation of rhodopsin. J Biol Chem 266: 17725—17728, 1991.
  - 40) **Findlay JBC, Bret M, Pappin DJC**: Primary structure of C-terminal functional sites in bovine rhodopsin. Nature 293: 314—316, 1981.
  - 41) **Palczewski K, Buczylo J, Kaplan MW, Polans AS, Crabb JW**: Mechanism of rhodopsin kinase activation. J Biol Chem 266: 12949—12955, 1991.
  - 42) **Ohguro H, Palczewski K, Ericsson LH, Walsh KA, Johnson RS**: Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites. Biochemistry 32: 5718—5724, 1993.
  - 43) **McDowell JH, Naerocki JP, Hargrave PA**: Phosphorylation sites in bovine rhodopsin. Biochemistry 32: 4968—4974, 1993.
  - 44) **Papac DI, Oatis JE, Crouch RK, Knapp DR**: Mass spectrometric identification of phosphorylation sites in bleached rhodopsin. Biochemistry 32: 5930—4934, 1993.
  - 45) **Pullen N, Akhtar M**: Rhodopsin kinase: Studies on the sequence of and the recognition motif for multiple phosphorylations. Biochemistry 33: 14536—14542, 1994.
  - 46) **Ohguro H, Johnson RS, Ericsson LH, Walsh KA, Palczewski K**: Control of rhodopsin multiple phosphorylation. Biochemistry 33: 1023—1028, 1994.
  - 47) **Ohguro H, Palczewski K**: Separation of phospho- and mono-phosphopeptides using reverse phase column chromatography. FEBS Lett 368: 452—454, 1995.
  - 48) **Hodgkin AL, McNaughton PA, Nunn BJ**: Measurement of sodium-calcium exchange in salamander rods. J Physiol 391: 347—370, 1987.
  - 49) **梶原一人**: 眼底疾患の分子遺伝学とDNA診断の最新情報. あたらしい眼科 12: 239—250, 1995.