

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

大黒 浩¹⁾, 深田 吉孝²⁾, 相馬 仁³⁾, 秋野 豊明³⁾, 中川 喬¹⁾

¹⁾札幌医科大学眼科学教室, ²⁾京都大学生物物理学教室, ³⁾札幌医科大学生化学教室

要 約

網膜視細胞において光に応答して起こる多くの反応のうち, 蛋白質のリン酸化および脱リン酸化は注目される反応の1つである. Lee らによってラット網膜で発見された光感受性に脱リン酸化を受ける 33 kDa 蛋白質に加え, 今回我々は, ウシおよびカエル網膜視細胞外節に存在する 39 kDa 蛋白質も同様に, 光感受性に脱リン酸化されることを初めて見いだした. あらかじめ無機リン (³²P) とインキュベートしてリン酸化しておいた網膜視細胞外節画分を明所および暗所に置いて, 脱リン酸化される様子を2次元電気泳動後のオートラジオグラフィーを比較検討した. また, これら 36 kDa および 39 kDa 蛋白質は, ウシおよびカエル網膜視細胞外節画分に共通に認められたことより, 脊椎動物に普遍的に存在し, 光感受性に脱リン酸化される蛋白質であることを示唆するものである. (日眼会誌: 97: 11-16, 1993)

キーワード: 網膜, 視細胞外節, リン酸化蛋白質, 脱リン酸化, 光感受性

Light-induced Dephosphorylation of Phosphoproteins in Rod Outer Segments in Bovine and Frog Retina

Hiroshi Ohguro¹⁾, Yoshitaka Fukada²⁾, Hitoshi Sohma³⁾,
Toyoaki Akino³⁾ and Takashi Nakagawa¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, ²⁾Department of Biochemistry, Sapporo Medical College

³⁾Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University

Abstract

Several lines of evidence have suggested that protein phosphorylation and dephosphorylation may play an important role in the regulation of metabolism and signal transduction processes. In our present study, bovine and frog retinas were incubated in Krebs' solution containing [³²P] H₃PO₄ for the labelling of all phosphoproteins. Then, photoreceptor outer segments were isolated from each retina, and further incubated under dark or light conditions. In such conditions, several phosphoproteins were dark- or light-dependently dephosphorylated. Interestingly, the light-dependent dephosphorylated 39 kDa protein as well as the 35-36 kDa protein was commonly observed in both bovine and frog retinas. The 35-36 kDa protein is considered to be the same as the 33 kDa protein that has previously been shown to be phosphorylated light-dependently, whereas 39 kDa protein is thought to be a novel protein that undergoes light-dependent dephosphorylation in retinal photoreceptor outer

別刷請求先: 060 札幌市中央区南1条西16丁目 札幌医科大学眼科学教室 大黒 浩

(平成4年3月31日受付, 平成4年6月11日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroshi Ohguro, M.D.ph.D. Department of Ophthalmology, Sapporo Medical College, S-1, W-16, Chuo-ku, Sapporo 060, Japan

(Received March 31, 1992 and accepted in revised form June 11, 1992)

segments. Thus, these proteins were thought to have significant roles in the visual transduction processes. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 11-16, 1993)

Key words: Retina, Photoreceptor outer segments, Phosphoprotein, Dephosphorylation, Light-induced

I 緒 言

細胞の多くは、外界からの様々な刺激に対し臨機応変に対応している。ほとんどの細胞は外界からの情報を受容し応答するために蛋白質のリン酸化および脱リン酸化反応を介する情報処理機構を備えている¹⁾。脊椎動物視細胞外節では、環状 guanosine monophosphate (以下 cGMP と略す) の細胞内濃度を制御する機構 (cGMP カスケード) が働くことにより光情報が過分極性の電気信号に変換されることが報告²⁾³⁾されている。すなわち、光電子が円板膜上に存在するロドプシンに吸収されると GTP 結合蛋白質トランスデュシン、cGMP 分解酵素である cGMP ホスホジエステラーゼが次々に活性化される。その結果、細胞質中の cGMP 濃度が急減し、形質膜に存在する cGMP 感受性チャンネルが閉鎖すると細胞内外にイオン勾配が発生する⁴⁾。これに加え、Lee ら⁵⁾は、ラット桿体視細胞外節において光感受性に脱リン酸化される可溶性の 33 kDa 蛋白質を初めて見だし、視細胞の光情報機構においても蛋白質のリン酸化および脱リン酸化が重要であることを示唆している。最近さらにこの蛋白質は、トランスデュシンの T β サブユニットと特異的に結合し、桿体視細胞外節の cGMP カスケードを調節しているものと考えられている⁶⁾。今回我々はさらに、Lee らが報告している 33 K 蛋白質以外の光条件で脱リン酸化が制御されるリン酸化の基質蛋白質の有無を検討するために、ウシおよびカエル網膜視細胞外節画分に存在するリン酸化基質蛋白質について検討を行った。

II 実験方法

1. 実験材料

[³²P] H₃PO₄ はアマーシャム社製、他の試薬は全て市販の生化学用 grade のものを用いた。江別畜産公社で摘出した眼球は、摘出後直ちに氷冷で 2 時間暗順応させたものを試料として用いた。一方カエルは、一晚暗順応させたのちに摘出した眼球を試料に用いた。

2. 網膜のリン酸化

Lee ら⁵⁾がラット網膜で行った方法をもとに網膜のリン酸化条件の検討を行った。暗室条件下 (以下すべてこの条件は、東芝社製の赤色ガラスフィルター VR 68 を装着した暗赤色灯下の条件とする) で十分に暗順応させた後に剥離したウシ網膜 1 枚を 100 μ M cGMP および 100 μ M isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) を含んだクレブス溶液中で 3 回洗浄後、[³²P] H₃PO₄ (0.2 mCi) を含む同緩衝液中に 5, 10, 30 および 120 分間室温でインキュベートした後、SDS-PAGE 試料液を加えて反応を停止させた。各試料を SDS 電気泳動後、ゲルを乾燥した。そのゲルのオートラジオグラムからリン酸化蛋白質の有無を検討した。

3. 網膜のリン酸化基質蛋白質の明暗での脱リン酸化

暗室条件下で新鮮なウシおよびカエル眼球それぞれ 4 眼を赤道面で切断し、網膜を剥離した。室温で、剥離した網膜を 3 回 100 μ M cGMP および 100 μ M IBMX を含むクレブス液で洗浄後、[³²P] H₃PO₄ (0.5 mCi) を含む同緩衝液中に 60 分間インキュベートした。反応終了後、網膜を 100 μ M cGMP および 100 μ M IBMX を含むクレブス液で 3 回洗浄後 3.5 ml の同緩衝液に懸濁した。網膜を含んだ懸濁液を下からショ糖濃度が 34%, 32% および 26% (W/V, 各 3 ml) になるように調製した非連続ショ糖密度勾配に重層し、25,000 回転で 4 $^{\circ}$ C, 1 時間遠心し視細胞桿体外節を含む画分を単離した。単離した視細胞外節画分を暗および明条件下 (通常の実験室の蛍光灯下) でそれぞれ 1 時間室温で放置し、脱リン酸化の様子を検討した。すなわち反応終了後、試料を 8 M 尿素を含んだ等電点電気泳動試料液に溶解し、等電点電気泳動を行った。次に 2 次元目の展開を SDS-PAGE で電気泳動後、乾燥させたゲルのオートラジオグラフィからリン酸化基質蛋白質の検討を行った。

4. 二次元電気泳動

O'Farrell⁷⁾の方法を一部改変して行った。等電点電気泳動ゲルは最終濃度で 5% アクリルアミド、8 M 尿

素, 10%Noidet-P 40 (NK-40), 2%アンフォライン (pH 3.5~10), 2%アンフォライン (pH 5~7), 0.004%リボフラビンとなるように調製したものを用いた。試料は 120 μ l 中に 4%アンフォライン, 8 M 尿素, 10%Noidet-P 40 を含むように調製し, その上に保護液 (4%アンフォライン, 8 M 尿素, 10%Noidet-P 40, 1%リジン) を重層した。0.01% H_3PO_4 溶液を陽極, 0.02 N NaOH を陰極として 200 V で 1 時間, 300 V で 13 時間, 次いで 500 V で 1 時間電気泳動を行った。SDS-PAGE による二次元目の展開は, 取り出したゲルを Laemmli の試料液で 37°C で 30 分間平衡化した後に行った。

5. Soidum dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) とオートラジオグラフィ

Laemmli⁸⁾の方法に準じて, 蛋白質試料 (40 μ l) に 10%SDS を 8 μ l, 0.05%プロモフェノールブルーを含む 75%グリセリンを 5 μ l, および 2-メルカプトエタノール 2 μ l を加えて 90°C, 5 分間処理後ゲルに添加した。電気泳動は 13%の分離ゲル (厚さ 1 mm) を用いた。電気泳動終了後, ゲルを脱染色および乾燥したのちに X 線フィルムを用いてオートラジオグラフィを行った。

III 結 果

1. ウシおよびカエル網膜における蛋白質のリン酸化

今回目的としたカエルおよびウシ網膜視細胞外節画分に存在するリン酸化基質蛋白質の検討を行う前段階としてウシ網膜を用いてリン酸化条件の検討を行った。その結果, 図 1 に示すようにオートラジオグラム上時間経過にほぼ一致し, 網膜蛋白質のリン酸化が促進された。なお, 著明にリン酸化された分子量が 39 kDa および 78 kDa 相当の蛋白質 (矢印) は, ロドプシンおよびその 2 量体と考えられた。

2. ウシおよびカエル網膜視細胞外節のリン酸化基質蛋白質の明暗による脱リン酸化の検討

ウシ網膜視細胞外節画分には, それぞれ図 2 のオートラジオグラフィおよびそのトレース図 3 の A (暗所条件) または B (明所条件) に示すように等電点 (PI) が 3.9 から 6.7 の範囲にそれぞれ 62 または 59 個のリン酸化された蛋白質のスポットが検出された。次にこれらのリン酸化基質蛋白質のうち, 明暗条件で異なった脱リン酸化を示すものが存在するか否かを検討する

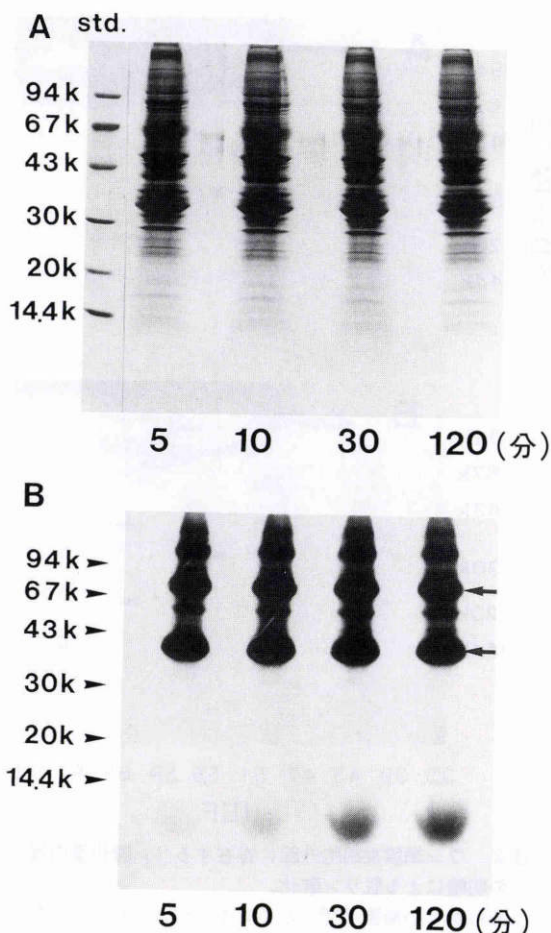


図 1 ウシ網膜のリン酸化蛋白質。

無機 (^{32}P) とそれぞれ 5, 10, 30 または 120 分インキュベートしてリン酸させたウシ網膜の (A) と SDS-電気泳動と (B) のゲルのオートラジオグラムを示す。ロドプシンおよびその 2 量体と思われるバンドをそれぞれ矢印で示す。std は標準タンパク質マーカーの略である。

ために, A と B を重ね合わせて比較検討を行った (図 3 C)。明暗条件で異なった脱リン酸化を示す特異蛋白質を分子量と等電点 (PI) で示す。その結果, 明条件下でのみ検出された (暗条件下でのみリン酸化された) 5 種の蛋白質 (1: 95 kDa/PI 6.1, 2: 58 kDa/PI 4.9, 3: 40 kDa/PI 6.4, 4: 35 kDa/PI 6.5, 5: 18 kDa/PI 5.4) および暗条件下でのみ検出された (明条件下でのみ脱リン酸化された) 3 種の蛋白質 (6: 42 kDa/PI 4.9, 7: 39 kDa/PI 5.0, 8: 36 kDa/PI 5.3) を見出した。同様にカエル網膜視細胞外節画分には暗条件 (図 4: オートラジオグラフィおよび図 5: そのトレースの

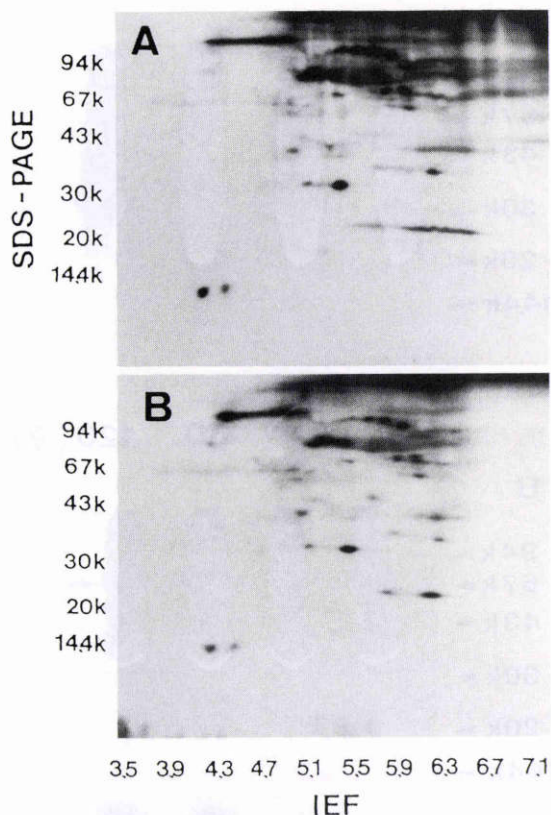


図2 ウシ網膜視細胞外節に存在するリン酸化蛋白質の明暗による脱リン酸化。

あらかじめ無機 (^{32}P) とインキュベートしてリン酸化させたウシ網膜視細胞外節画分を明所(A)または暗所(B)で脱リン酸化させた。試料を2次元電気泳動させたのちにゲルのオートラジオグラフィーを行った。SDS-PAGE および IEF は、それぞれ SDS 電気泳動および等電点電気泳動 isoelectric focusing electrophoresis の略である。各図の縦および横軸はそれぞれ分子量および等電点を示す。

A) または明条件(図4: オートラジオグラフィーおよび図5: そのトレースの B) において等電点が 4.3 から 7.1 の範囲にそれぞれ 28 または 23 個のリン酸化された基質蛋白質が検出された。いずれの条件においてもカエル視細胞外節画分に存在するリン酸化基質蛋白質の二次元電気泳動上の分布はウシのそれと異なっていた。しかしカエルの場合においても図5Cに示すように明条件または暗条件でのみ検出された特異蛋白質は、それぞれ5種(1: 84 kDa/PI 6.0, 2.8 kDa/PI 6.8, 3: 8 kDa/PI 6.9, 4: 7 kDa/PI 6.8, 5: 7 kDa/PI 6.9) または5種(6: 89 kDa/PI 5.0, 7: 36 kDa/PI 5.0,

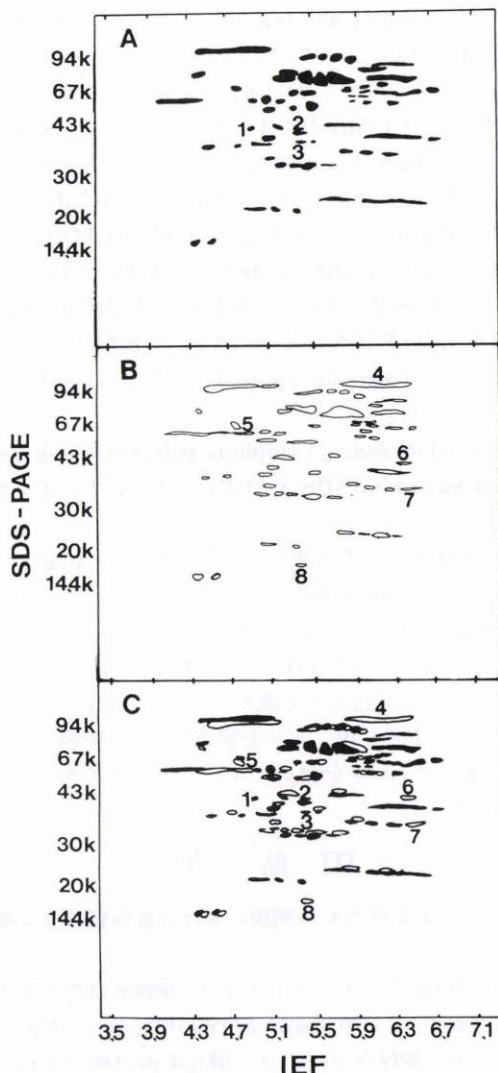


図3 ウシ網膜視細胞外節に存在するリン酸化蛋白質の明暗による脱リン酸化。

A および B はそれぞれ図2のオートラジオグラフィーA および B のトレースを示す。さらに C は A と B の違いを明らかにするために両図を重ね合わせたものである。各図の縦および横軸はそれぞれ分子量および等電点を示し、図中に示された 1-8 は A と B で違うリン酸化蛋白質のスポットを示している。

8: 27 kDa/PI 5.7, 9: 28 kDa/PI 6.2, 10: 22 kDa/PI 6.4) が検出された。

IV 考 按

蛋白質のリン酸化および脱リン酸化は、細胞内で起

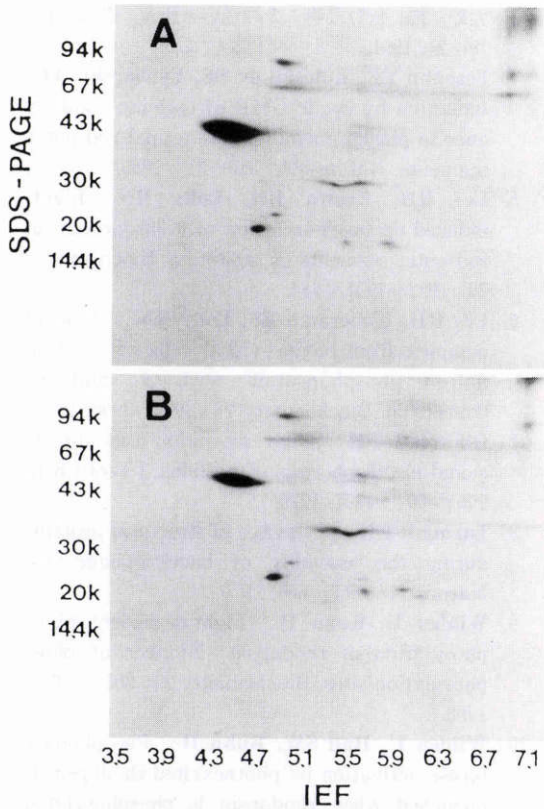


図4 カエルの網膜視細胞外節に存在するリン酸化蛋白質の明暗による脱リン酸化。

あらかじめ無機 (^{32}P) とインキュベートしてリン酸化させたカエル網膜視細胞外節画分を明所(A)または暗所(B)で脱リン酸化させた。試料を2次元電気泳動させたのちにゲルのオートラジオグラフィーを行った。SDS-PAGE および IEF は、それぞれ SDS 電気泳動および等電点電気泳動 isoelectric focusing gel electrophoresis の略である。各図の縦および横軸はそれぞれ分子量および等電点を示す。

この酵素で触媒される可逆反応で、生体における細胞内情報伝達機構の担い手と考えられている。視細胞桿体外節においても視物質ロドプシンは1分子あたり9箇所のリン酸化部位を持つリン酸化基質蛋白質である⁹⁾。興味深いことに視細胞桿体外節内でロドプシンがリン酸化されると、これが視興奮を引き起こす cGMP カスケードを停止させることが知られている¹⁰⁾¹¹⁾。すなわち、ロドプシンがリン酸化されると、これに 48 kDa 蛋白質(s 抗原またはアレステチンとも呼ばれる)が結合し不活化させると考えている。さらに Lee ら⁵⁾は、1984 年ラット網膜視細胞外節に明暗で制御さ

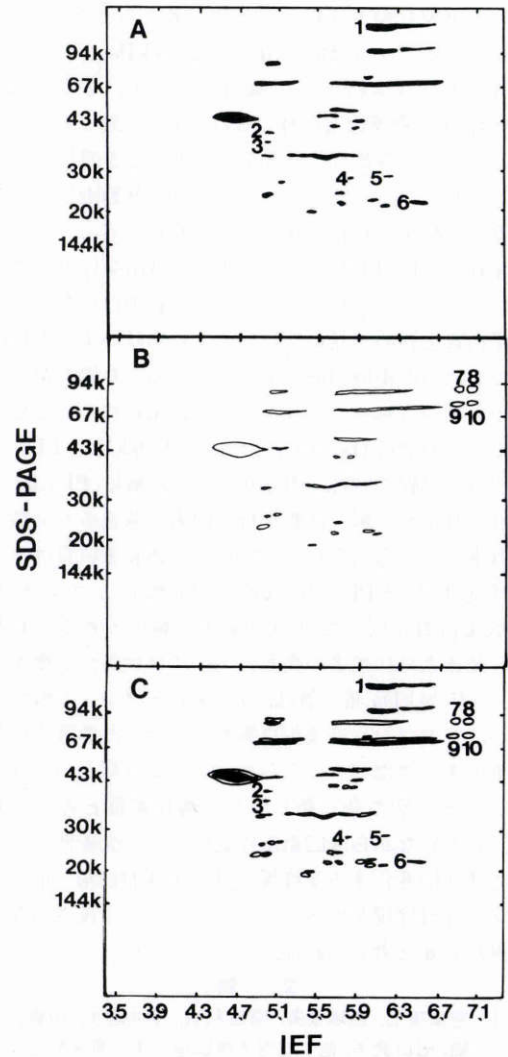


図5 カエル網膜視細胞外節に存在するリン酸化蛋白質の明暗による脱リン酸化。

A および B はそれぞれ図2のオートラジオグラフィーA および B のトレースを示す。さらに C は A と B の違いを明らかにするために重ね合わせたものである。各図の縦および横軸はそれぞれ分子量および等電点を示し、図中に示された 1-10 は A と B で違うリン酸化蛋白質のスポットを示している。

れる 33 kDa 蛋白質を見出した。その後、この 33 kDa 蛋白質は、Kuo ら¹²⁾の報告した視細胞外節に特異的に存在する MEKA 蛋白質と同一であることがわかった。この 33 kDa 蛋白質は視細胞 GTP 結合蛋白質であるトランスデュシンの $\beta\gamma$ サブユニット ($T\beta\gamma$) と複合体を形成し、視細胞における視興奮初期過程に

において重要な役割を担っていると考えられている⁶⁾。Lee ら⁵⁾は、ラット網膜に存在する 33 kDa リン酸化蛋白質の等電点は約 5.25 と報告している。さらに Lee ら⁶⁾は、ウシ網膜にも同様の 33 kDa リン酸化蛋白質が存在し、その等電点は約 5.7 であることを報告している。今回ウシおよびカエル網膜視細胞外節画分に存在するリン酸化基質蛋白質の脱リン酸化反応について電気泳動的に検討したところ、明または暗条件のいずれかのみで脱リン酸化する今までに報告のない数種の基質蛋白質を初めて見いだした。これらはいずれも視細胞の光情報の細胞内情報伝達でなんらかの働きをもつものと推定される。これらのうち暗条件でのみ認められるウシの 39 kDa (PI 5.3) および 36 kDa (PI 5.3) はカエル網膜の 39 k (PI 5.0) および 36 k (PI 5.0) とそれぞれ極めて似た性質を持ち両者で共通のリン酸化基質蛋白質と考えられた。このうち 36 k 蛋白質はその分子量および PI より、Lee ら⁵⁾が報告している 33 kDa 蛋白質と同一である可能性が高いと考えられたが、今後さらに両者の異同については検討が必要である。一方 39 kDa 蛋白質は、分子量ロドプシンと似ているが、ロドプシンは膜蛋白質で今回行った等電点電気泳動の条件ではゲルに入らないことより明らかにロドプシンとは別の全く新しいリン酸化基質と考えられた。しかしながら今回新たに見いだした光条件でリン酸化状態が変化する基質蛋白質の生理的役割と蛋白質化学的性質は現在のところ不明であり、今後さらなる検討が必要と考えられた。

文 献

- 1) 宮本英七, 西塚泰美, 堅田利明, 宇井理生, 中根正樹, 出口武夫, 他: 細胞情報伝達と蛋白質磷酸化反応. 宮本英七, 西塚泰美(編): 蛋白質核酸酵素, 31, 共立出版, 東京, 1690—2065, 1986.
- 2) 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.
- 3) 大野 浩, 秋野豊明: 光の受容と伝達. 遺伝 45: 19—24, 1991.
- 4) Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL: Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segments. *Nature* 313: 310—313, 1985.
- 5) Lee RH, Brown BH, Lolly RN: Light-induced dephosphorylation of a 33k protein in rod outer segments of rat retina. *Biochemistry* 23: 1927—1937, 1984.
- 6) Lee RH, Lieberman BS, Lolly RN: A novel complex from bovine visual cells of a 33000-dalton phosphoprotein with β - and γ -transducin. *Biochemistry* 26: 3983—3990, 1987.
- 7) O'Farrell PH: High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007—4021, 1975.
- 8) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680—685, 1970.
- 9) Wilden U, Kuhn H: Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: Number of phosphorylation sites. *Biochemistry* 21: 3014—3022, 1982.
- 10) Wilden U, Hall SW, Kuhn H: Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1174—1178, 1986.
- 11) Zuckerman R, Cheasty JE: A 48kDa protein arrests cGMP phosphodiesterase activation in retinal rod disk membrane. *FEBS Lett* 207: 35—41, 1986.
- 12) Kuo C-H, Taniura H, Watanabe Y, Fukada Y, Yoshizawa T, Miki N: Identification of a MEKA protein as a 33k protein. *Biochem Biophys Res Commun* 162: 1063—1068, 1989.