1D1645

ウシ視細胞PDEが活性化に伴ってラフト様膜分画へ移行するメカニズム

○劉 涵¹、妹尾 圭司¹、林 文夫^{1,2} (¹神戸大院・自然科学、²神戸大・理学部・生物)

目的：昨年の本学会において、ウシ視細胞桿体外節（ROS）にも Triton X-100 難溶膜分画（ラフト様膜分画）が存在し、光とヌクレオチドの刺激で cGMP 加水分解酵素（PDE: $P\alpha\beta\gamma$ 2）がラフト様膜分画へ移行することを報告した。このような PDE の脂質相間移動が光信号伝達機構で重要な役割を果たしている可能性が示唆されたため、ラフト様膜分画への PDE 移行のメカニズムについて検討した。方法：ウシ ROS を種々の条件下でインキュベートした後、1% Triton X-100 を用いて可溶化し、ショ糖密度勾配遠心法でラフト様膜分画を得た。SDS-PAGE 後 CBB 染色や免疫プロット法を用いてタンパクの分布やその変化、PDE 活性などを検討した。結果：光と非水解性 GTP アナログによってトランスデュースン（ $T\alpha\beta\gamma$ ）を活性化すると PDE はラフトへ移行するが、暗黒中でも $T\alpha$ の遷移状態を安定化させるフッ化アルミニウム（AlF）を与えると同様の結果が得られた。過剰な PDE 阻害サブユニット（ $P\gamma$ ）を追加すると AlF による PDE の移行は完全に阻害された。ラフトに集合した PDE の活性は最大活性を維持していた。ラフト様膜領域には $T\alpha$ の GTPase 活性化因子（GAP）である RGS9/G β 5L の局在が認められた。考察：PDE のラフト様膜領域への移行は $T\alpha$ の活性化に依存している。 $P\gamma$ が移行を抑制することから $T\alpha$ の結合相手は $P\gamma$ であり、 $T\alpha$ は $P\gamma$ を介して PDE と結合・活性化させ、AlF-GDP- $T\alpha$ -PDE 複合体としてラフト様膜領域に移行すると考えられる。ラフト様膜に局在する $T\alpha$ の GAP がこの複合体の結合部位である可能性が高い。ラフト様膜領域では $T\alpha$ による PDE の活性化とそれに続く迅速な不活性化が行われていると推測される。

H. Lin, K. Seno and F. Hayashi : Molecular mechanism underlying activation-dependent translocation of PDE to raft-like membrane of bovine photoreceptor outer segments

1D1715

コイ網膜で発現する GRK1 および GRK7 遺伝子 cDNA クローンの単離

○松川（嶋内）淑恵¹、阿萬 喜伸²、橘木 修志²、河村 悟¹ (¹阪大院・生命機能、²阪大院・理・生物)

桿体型視細胞と錐体型視細胞の光応答の特性の違いが生じる原因の一つとして、視物質がリン酸化を受ける速さが大きく異なることが示されている。視物質のリン酸化には、G-protein coupled receptor kinase (GRK) が関与しており、桿体では GRK1、錐体では GRK7 というように異なる GRK のサブタイプが発現していることが知られている。我々は、GRK の性質についてより詳細に研究する目的で、コイ GRK の単離を試みた。

縮重オリゴをもちいた網膜 cDNA に対する PCR により、4 種類の GRK1 類似配列と 2 種類の GRK7 類似配列を持つ断片を得た。これらの配列から予測されるアミノ酸配列を用いて分子系統樹を作成したところ、GRK7 類似配列 2 つは何れも既知の GRK7 配列と、GRK1 類似配列 4 つのうち 2 つはは乳類 GRK1 と、残りの 2 つはニワトリ GRK1 と、それぞれクラスターを形成することがわかった。この結果は、これまで GRK1 と呼ばれていた遺伝子が主には乳類 GRK1 に近いものとニワトリ GRK1 に近いものの 2 系統に分類されること、コイ網膜では両者が発現していること、を示す。また、GRK7 や GRK1 のは乳類型、ニワトリ型に相同な遺伝子がコイで 2 種類ずつ存在することは、分子系統樹上の相互関係から、4 倍体起源といわれるコイの進化の過程で染色体が重複したことに起因していると考えられる。

これらの遺伝子をコードする mRNA の発現パターンを in situ hybridization 法で調べた。その結果、コイ GRK7 mRNA は錐体型視細胞層で発現していた。コイ GRK1（は乳類型）mRNA は桿体型視細胞層で発現しており、コイ GRK1（ニワトリ型）mRNA は、視細胞層以外にも、神経節細胞やアマクリン細胞での強いシグナルが観察された。

Y. Shimauchi-Matsukawa, Y. Aman, S. Tachibanaki and S. Kawamura : Isolation of carp retinal cDNA clones encoding GRK1 and GRK7

1D1700

桿体視細胞の遺伝子発現プロファイル作成の試み

○阿萬 喜伸¹、松川（嶋内）淑恵²、橘木 修志¹、河村 悟^{1,2} (¹阪大院・理・生物、²阪大院・生命機能)

脊椎動物網膜には、形態的な特徴から桿体および錐体の 2 種類の視細胞がある。我々は、コイの桿体を密度勾配遠心法で精製し、主に桿体由来する cDNA ライブラリーを作製した。ライブラリー作製の際には PCR による増幅や平均化をしていない。よってこのライブラリーから網羅的に cDNA 配列を決定すれば、より native な状態に近い遺伝子発現プロファイルの作成が期待できる。また、精製桿体由来のライブラリーなので、光応答機構や形態など、桿体の特性を決める未知の遺伝子の効率的な同定が期待できる。

我々はこれまでに 347 クローンの塩基配列の一部を決定し、それぞれの配列について公共の核酸・蛋白質配列データベースに対して BLAST 検索を行った。その結果、347 クローン中、82%（286 クローン）がデータベース上の配列と有意な相同性がみられた。この 286 クローンを大きく 4 つのカテゴリーに分類し、全体に占める割合でみると、48% がハウスキープ遺伝子、14% が桿体特異的な遺伝子、1% が錐体特異的な遺伝子、20% がヒト・マウスでの EST データやその他何らかの既知遺伝子であった。データベース上の配列と相同性が認められない、新規遺伝子と思われるクローンは全体の 18%（61 クローン）であった。

また、重複を除くと 170 種類の独立な遺伝子が含まれており、ハウスキープ遺伝子が 35 種類（21%）、桿体特異的な遺伝子が 6 種類（4%）、その他の既知遺伝子が 65 種類（38%）、新規と思われる遺伝子が 60 種類（35%）であった。錐体特異的な遺伝子も 4 種類（2%）含まれていた。なお、最も出現頻度が高かった遺伝子は桿体オプシン（ロドプシン）の 35 クローンであった。

現在、in situ hybridization 法を用いてそれぞれの遺伝子クローンの網膜での発現部位を解析中である。

Y. Aman, Y. Shimauchi-Matsukawa, S. Tachibanaki, S. Kawamura : A gene expression profile in isolated rods

1E0900

ミオシン頭部の取り得るさまざまなコンフォメーションの 3 次元画像解析

○片山 栄作¹、市瀬 紀彦¹、高橋 透友²、八重口 直樹²、吉沢 強志³、丸田 晋策³、馬場 則男² (¹東大・医科研・分子構造解析、²工学院大・電気工学、³創価大・工・生物工学)

ミオシン頭部は、ATP を結合して加水分解し、アクチンと相互作用して滑り運動をひき起こす過程でさまざまな構造を取り得る。また、C 端のレバーアーム部分の屈曲が張力を発生させる源と信じられている。1993 年にトリ・ミオシン S 1 全長の X 線結晶構造が発表されて以来、さまざまなヌクレオチド結合状態の結晶構造が報告された。しかしその多くは肝心のレバーアームを欠失した変異種であり、その部分の構造変化に関する実験データは不十分であった。Houdusse らは、ホタテ貝ミオシンの全長 S 1 を材料として、それらが 3 種類の異なる構造を取り得ることを初めて示したが、それらがすべてのコンフォメーションを尽くしているとは限らない。急速凍結ディープエッチ・レプリカ電子顕微鏡法を用いれば、高いコントラストで蛋白質分子の実像を得られるので、1 個 1 々の分子の 3 次元構造を一切の平均化なしに解析することが可能となる。また結晶化できない蛋白質分子も構造解析の対象とできる。ここ数年来われわれは、傾斜撮影したレプリカ画像から対象分子の表面構造を 3 次元画像解析するための新たな手法の開発を進めてきた。そこで、さまざまなヌクレオチドの結合状態で、あるいはアクチンと相互作用する場合に個々のミオシン頭部が取り得るコンフォメーションを解析し、Houdusse らの結晶構造との比較を行った。これまで、平滑筋 S 1 などレバーアームのない頭部の結晶から推定されていた構造はレプリカ像中には存在しなかったが、ホタテ貝 S 1 の原子モデルに似た構造はしばしば見出された。その意味で、彼らの報告した構造は溶液中で生理的に実現する構造に近いと考えられる。しかし、ヌクレオチド存在下で化学架橋した場合やアクチン滑り運動中の一瞬に見られるコンフォメーションにおいては、これまで報告のない新たな構造が実現していると思われる。

E. Katayama, N. Ichise, Y. Takahashi, N. Yaguchi, T. Yoshizawa, S. Maruta and N. Baba : Three-dimensional Image Analysis of Various Configurations of Myosin Head