

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15548

研究課題名(和文) 網膜視細胞における明暗順応制御メカニズムの解明と網膜保護への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the regulatory mechanism underlying light and dark adaptation in retinal photoreceptor cells and its application to retinal protection

研究代表者

茶屋 太郎 (CHAYA, Taro)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：50747087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：視覚は網膜視細胞が光を受容することによって開始されるが、光はまた網膜視細胞にとって有害なものとなりうる。桿体視細胞は暗所下で光に対して感度を上昇させるが、一方で光感度を低下させ過剰な細胞の興奮を避けることによって、明るい光から細胞を守っている。しかしながら、その制御メカニズムは不明であった。本研究において、私たちはKlhl18ユビキチンライゲースが明暗順応に関与することが知られる三量体Gたんぱく質トランスデュシンの光依存的な細胞内局在変化を制御することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜変性を引き起こすメカニズムの一つとして光によるダメージが知られている。光の長期曝露によって代謝老廃物や細胞ストレスの蓄積が進み、視細胞や網膜色素上皮の機能低下や細胞死などが引き起こされ、加齢黄斑変性や網膜色素変性症を含む視覚障害の発症や増悪につながる事が報告されている。それゆえ光によるダメージを減弱することは網膜保護や変性進行抑制の観点から重要である。明順応による光受容感度の低下は視細胞の光によるダメージを軽減する役割を持つことが知られており、本研究の成果により得られた知見は直接、網膜保護へ向けた新しい創薬ターゲットになる可能性を秘めていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Vision begins with light reception by retinal photoreceptor cells, and yet light can be harmful to these photoreceptors. Although rod photoreceptors become sensitive to light in darkness, they can also reduce the light sensitivity and avoid excessive activation, which protects them from brighter light. However, the underlying regulatory mechanisms remain unclear. In this study, we found that Klhl18 ubiquitin ligase regulates light-dependent translocation of a heterotrimeric G protein, transducin, a cellular process that is involved in light/dark adaptation.

研究分野：神経生物学

キーワード：網膜 視細胞 順応 繊毛 細胞内輸送 ユビキチン Gたんぱく質 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜視細胞において、暗いところでは光感度を上げることによって弱い光を感知することが可能となり(暗順応)、明るいところでは光感度を下げることによって飽和せずに物を見ることが出来る(明順応)。この明暗順応機構の働きにより外部の光環境に応じた適切な視覚を獲得することが可能となり、その明るさの範囲は 10^{12} 以上にも及ぶと言われている。視細胞における明暗順応では光情報伝達系を担うたんぱく質の外節と細胞体間の局在の変化が重要な役割を果たすことが知られており、例えば三量体 G たんぱく質トランスデューシンは暗順応条件下では外節に明順応条件下では細胞体に、アレスチンは逆に暗順応条件下では細胞体に明順応条件下では外節に主な局在が変化するが、それを制御する分子メカニズムはいまだに不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では網膜視細胞の明暗順応制御機構を明らかにするために、私たちが新たに見出した明暗順応時の細胞体-外節間たんぱく質輸送に関与することが示唆されるユビキチン E3 ライゲース Kih18 の機能を解析する。これにより新たな明暗順応の分子機構を解明し、その制御によって光による網膜へのダメージを抑制する技術の開発へ向けた基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

Kih18 の網膜における発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法や作製した抗体による免疫染色によって観察した。Kih18 と標的たんぱく質の生化学的解析を行った。さらに、Kih18 のノックアウトマウスを作製し、網膜組織の免疫染色解析や網膜電図(ERG)測定による電気生理学的解析などの生体機能解析を行った。Kih18 の標的たんぱく質の過剰発現実験を、マウス網膜への生体エレクトロポレーション法を用いて行った。

4. 研究成果

私たちは、生体内で機能未知のユビキチン E3 ライゲース Kih18 が網膜視細胞に高発現していることを見出した。Kih18 欠損マウスを作製し表現型解析を行うと、このマウスは網膜の細胞構成や視細胞の外節やシナプス形成に関して明らかな異常は示さなかった。しかし、網膜電図により視細胞の機能を調べると、Kih18 欠損マウスは明所での光応答に影響がなかったが、暗所での光応答が有意に低下していた(図1)。この結果から、Kih18 の欠損により、錐体視細胞の光受容感度は正常であるが、桿体視細胞の光受容感度が低下することが示唆された。暗順応条件下では、トランスデューシンは光受容感度を上昇させるため細胞体から外節へと移動し集積する。Kih18 欠損マウスでは暗順応条件下にもかかわらず、明順応下の野生型マウスと同様にトランスデューシン サブユニットが細胞体において局在しており、「明順応状態」化していた(図2)。一方で、トランスデューシン サブユニットに関しては、野生型マウスと Kih18 欠損マウスとの間で細胞内局在に明らかな差は認められなかった。

また、申請者は Kih18 の標的候補たんぱく質として Unc119 に着目した。以前の報告より、Unc119 はトランスデューシン サブユニットと結合すること、ロドプシンを介したトランスデューシンの活性化を抑制することが報告されている。免疫沈降法や GST プルダウンアッセイ、TR-FRET アッセイを行うと、Kih18 と Unc119 の結合が観察された。培養細胞において Unc119 の発現は Kih18 により減少し、この発現減少はプロテアソーム阻害剤 MG132 により抑制された。ヒスチジンタグ付加ユビキチンを用いたプルダウンアッセイにより、Kih18 による Unc119 のユビキチン化が見られた。また、Kih18 欠損マウス網膜では Unc119 の mRNA レベルでの発現は変化がなかったが、たんぱく質レベルでの発現が上昇していた。さらに、Unc119 を網膜視細胞に過剰発現すると Kih18 欠損マウス網膜と同様のトランスデューシン サブユニットの局在異常を示した。これらの結果より、Kih18 は Unc119 のユビキチン化、分解を介してトランスデューシンの局在を制御することが示唆された。

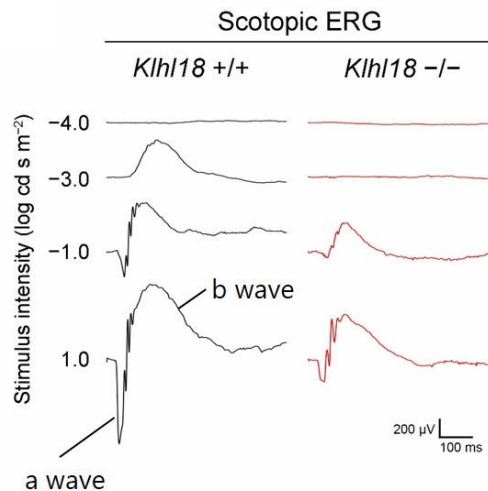


図1. Kih18 欠損マウス(右)では暗所下での視細胞(a波)とそれに続く双極細胞(b波)の光に対する応答が低下している。

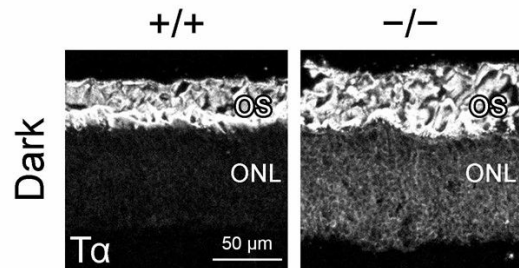


図2. Kih18 欠損マウス(右)では暗所下でトランスデューシンの局在が「明順応状態」化している。

私たちの結果は、たんぱく質のユビキチン化修飾が視細胞の明暗順応を制御するという今まで想定されてこなかった新たな概念の創出を強く示唆するものであり、独自性が高いと考えられる。網膜変性を引き起こすメカニズムの一つとして光によるダメージが知られている。私たちが外界の光を網膜に受けて物を見るのと引き換えに、光の長期曝露によって代謝老廃物や細胞ストレスの蓄積が徐々に進み、視細胞や網膜色素上皮の機能低下や細胞死などが引き起こされ、加齢黄斑変性や網膜色素変性症を含む視覚障害の発症や増悪につながるということが報告されている。それゆえ光によるダメージを減弱することは網膜保護や変性進行抑制の観点から重要である。明順応による光受容感度の低下は視細胞の光によるダメージを軽減する役割を持つことが知られており、本研究の成果により得られた知見は直接、網膜保護へ向けた新しい創薬ターゲットに結びつく可能性を秘めていると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- (1) Kozuka T, Omori Y, Watanabe S, Tarusawa E, Yamamoto H, Chaya T, Furuhashi M, Morita M, Sato T, Hirose S, Ohkawa Y, Yoshimura Y, Hikida T, Furukawa T. miR-124 dosage regulates prefrontal cortex function by dopaminergic modulation. *Sci. Rep.* in press, 2019
doi: 10.1038/s41598-019-38910-2 査読あり
- (2) Tsutsumi R, Chaya T, Furukawa T. Enriched expression of the ciliopathy gene *Ick* in cell proliferating regions of adult mice. *Gene Expr. Patterns.* 29:18-23, 2018
doi: 10.1016/j.gep.2018.04.005 査読あり
- (3) Ueno A, Omori Y, Sugita Y, Watanabe S, Chaya T, Kozuka T, Kon T, Yoshida S, Matsushita K, Kuwahara R, Kajimura N, Okada Y, Furukawa T. *Lrit1*, a Retinal Transmembrane Protein, Regulates Selective Synapse Formation in Cone Photoreceptor Cells and Visual Acuity. *Cell Rep.* 22(13):3548-3561, 2018
doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.007 査読あり
- (4) Omori Y, Kubo S, Kon T, Furuhashi M, Narita H, Kominami T, Ueno A, Tsutsumi R, Chaya T, Yamamoto H, Suetake I, Ueno S, Koseki H, Nakagawa A, Furukawa T. *Samd7* is a cell type-specific PRC1 component essential for establishing retinal rod photoreceptor identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114(39):E8264-E8273, 2017
doi: 10.1073/pnas.1707021114 査読あり
- (5) Kozuka T, Chaya T, Tamalu F, Shimada M, Fujimaki-Aoba K, Kuwahara R, Watanabe SI, Furukawa T. The TRPM1 Channel Is Required for Development of the Rod ON Bipolar Cell-All Amacrine Cell Pathway in the Retinal Circuit. *J. Neurosci.* 37(41):9889-9900, 2017
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0824-17.2017 査読あり
- (6) Chaya T, Matsumoto A, Sugita Y, Watanabe S, Kuwahara R, Tachibana M, Furukawa T. Versatile functional roles of horizontal cells in the retinal circuit. *Sci. Rep.* 7(1):5540, 2017
doi: 10.1038/s41598-017-05543-2 査読あり

〔学会発表〕(計23件)

- (1) 茶屋太郎, 堤 峻太郎, Leah Rie Varner, 前田和, 古川貴久, 網膜視細胞における明暗順応制御メカニズム、第11回RRM(Retina Research Meeting) 東京、2018年12月1日
- (2) 堤峻太郎, 茶屋太郎, 古川貴久, 成体期における繊毛局在キナーゼ *Ick* の機能解析, 第41回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2018年11月28日
- (3) 茶屋太郎, 堤 峻太郎, Leah Rie Varner, 古川貴久, 網膜視細胞における繊毛内輸送を介した光受容感度調節メカニズム、第91回日本生化学会大会、京都、2018年9月25日
- (4) 上野明希子, 茶屋太郎, 古川貴久, ミュラーグリア細胞における転写因子 *Rax* の機能解析, 第91回日本生化学会大会、国立京都国際会館(京都府京都市), 2018年9月25日(口頭)
- (5) 上野明希子, 茶屋太郎, 古川貴久, ミュラーグリア細胞における転写因子 *Rax* の機能解析, 第91回日本生化学会大会、国立京都国際会館(京都府京都市), 2018年9月25日(ポスター)
- (6) Taro Chaya, Yuko Sugita, Hiroshi Ishikane, Takahisa Furukawa, Functional roles of the Fragile X Syndrome-related gene in the retina, ISER 2018, Belfast Waterfront, Belfast, Northern Ireland, UK, September 11, 2018.
- (7) 茶屋太郎, 杉田祐子, 三草周平, 古川貴久, 網膜における脆弱X症候群関連遺伝子の機能解析、第41回日本神経科学大会、神戸、2018年7月26日
- (8) Takahisa Furukawa, Taro Chaya, Ryotaro Tsutsumi, Lessons from KO mice of the genes regulating retinal photoreceptor development and function, 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto, Japan, Jul. 3, 2018
- (9) 堤峻太郎, 茶屋太郎, 古川貴久, 成体マウスにおける繊毛病原因遺伝子 *Ick* の機能解析,

第 65 回日本生化学会近畿支部例会, 兵庫医科大学(兵庫県西宮市), 2018 年 5 月 26 日(口頭)

- (10) 堤峻太郎, 茶屋太郎, 古川貴久, 成体マウスにおける繊毛病原因遺伝子 Ick の機能解析, 第 65 回日本生化学会近畿支部例会, 兵庫医科大学(兵庫県西宮市), 2018 年 5 月 26 日(ポスター)
- (11) 茶屋太郎, 小塚孝司, 田丸文信, 島田真理子, 栗原隆亮, 渡辺修一, 古川貴久, TRPM1 チャネルの網膜神経回路発達における役割, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017 年 12 月 9 日(口頭)
- (12) 茶屋太郎, 小塚孝司, 田丸文信, 島田真理子, 栗原隆亮, 渡辺修一, 古川貴久, TRPM1 チャネルの網膜神経回路発達における役割, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017 年 12 月 8 日(ポスター)
- (13) 大森義裕, 久保竣, 今鉄男, 古橋真佑, 成田宏隆, 上野明希子, 堤峻太郎, 茶屋太郎, 上野真治, 古関明彦, 中川敦史, 古川貴久, SAM ドメイン蛋白質 Samd7 は網膜桿体視細胞の最終分化をエピジェネティックに制御する組織特異的なポリコーン複合体 1 の構成要素である, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(Conbio2017)ワークショップ「古くて新しいポリコーン: そのエピジェネティック制御機構をマウスと一緒に考える」(オーガナイザー大森義裕・磯野協一), 神戸ポートアイランド第 2 会場(神戸ポートピアホテル本館 地下 1 階 偕楽 2)(兵庫県神戸市), 2017 年 12 月 7 日
- (14) Takashi Kozuka, Taro Chaya, Takahisa Furukawa, Role of TRPM1 channel in retinal circuit development, オーストラリア国立大学・蛋白研合同シンポジウム IPR/RSC Symposium, 蛋白質研究所 1 階リフレッシュルーム, 2017 年 12 月 4 日(月)
- (15) Akiko Ueno, Yoshihiro Omori, Yuko Sugita, Taro Chaya, Takashi Kozuka, Satoshi Watanabe, Satoyo Yoshida, Shoichi Irie, Ryusuke Kuwahara, Naoko Kajimura, Yasushi, Okada, Takahisa Furukawa, Analysis of photoreceptor synapse formation machinery in the mouse retina, 第 12 回研究所ネットワーク国際シンポジウム 12th International Symposium of the Institute Network -Driving Next-Generation Medicine: the Spirit of Pioneering Discovery in Medical Science-, 東京大学医科学研究所講堂 2 号館 2 階大・小講義室(東京都港区), 2017 年 11 月 28 日
- (16) Taro Chaya, Takahisa Furukawa. Roles of retinal horizontal and bipolar cells in visual information processing. The 5th Korea-Japan Joint Meeting of Clinical Electrophysiology of Vision, Senri Life Science Center, Osaka, November 18, 2017
- (17) 久保竣, 大森義裕, 今鉄男, 古橋真佑, 成田宏隆, 上野明希子, 堤峻太郎, 茶屋太郎, 上野真治, 古関明彦, 中川敦史, 古川貴久, SAM ドメイン蛋白質 Samd7 はエピジェネティック機構により網膜桿体視細胞の最終分化を制御する Samd7, a SAM domain protein, regulates terminal differentiation of retinal rod photoreceptor cells, 第 40 回日本神経科学大会, 幕張メッセ(千葉県千葉市), 2017 年 7 月 21 日
- (18) 岡本志央, 茶屋太郎, 大森義裕, 栗原隆亮, 久保竣, 坂口博史, 古川貴久, 繊毛局在キナーゼ ICK は内耳有毛細胞の平面内細胞極性と聴覚機能に必須である, 第 94 回日本生化学会近畿支部例会, 大阪大学豊中キャンパス 全学教育推進機構 講義 A 棟(大阪府豊中市), 2017 年 5 月 27 日(口頭)
- (19) 岡本志央, 茶屋太郎, 大森義裕, 栗原隆亮, 久保竣, 坂口博史, 古川貴久, 繊毛局在キナーゼ ICK は内耳有毛細胞の平面内細胞極性と聴覚機能に必須である, 第 94 回日本生化学会近畿支部例会, 大阪大学豊中キャンパス 全学教育推進機構 講義 A 棟(大阪府豊中市), 2017 年 5 月 27 日(ポスター)
- (20) 小塚孝司, 茶屋太郎, 田丸文信, 島田真理子, 栗原隆亮, 渡辺修一, 古川貴久, 網膜神経回路の発達には TRPM1 チャネルの機能が必須である, 第 94 回日本生化学会近畿支部例会, 大阪大学豊中キャンパス 全学教育推進機構 講義 A 棟(大阪府豊中市), 2017 年 5 月 27 日(口頭)
- (21) 小塚孝司, 茶屋太郎, 田丸文信, 島田真理子, 栗原隆亮, 渡辺修一, 古川貴久, 網膜神経回路の発達には TRPM1 チャネルの機能が必須である, 第 94 回日本生化学会近畿支部例会, 大阪大学豊中キャンパス 全学教育推進機構 講義 A 棟(大阪府豊中市), 2017 年 5 月 27 日(ポスター)
- (22) Meriam Boubakri, Taro Chaya, Hiromi Hirata, Naoko Kajimura, Ryusuke Kuwahara, Akiko Ueno, Jarema Malicki, Takahisa Furukawa, Yoshihiro Omori, Progressive photoreceptor degeneration caused by retrograde IFT complex component defect, leads to inefficient opsin transport, 第 94 回日本生化学会近畿支部例会, 大阪大学豊中キャンパス 全学教育推進機構 講義 A 棟(大阪府豊中市), 2017 年 5 月 27 日(口頭)
- (23) Meriam Boubakri, Taro Chaya, Hiromi Hirata, Naoko Kajimura, Ryusuke Kuwahara, Akiko Ueno, Jarema Malicki, Takahisa Furukawa, Yoshihiro Omori, Progressive photoreceptor degeneration caused by retrograde IFT complex component defect, leads to inefficient opsin transport, 第 94 回日本生化学会近畿支部例会, 大阪大学豊中キャンパス 全学教育推進機構 講義 A 棟(大阪府豊中市), 2017 年 5 月 27 日(口頭)(ポスター)

〔図書〕(計1件)

- (1) 茶屋太郎, どうして心臓は動き続けるの? : Part 4, 19「痛みはどのようにして感じるの?」pp. 80-83, 大阪大学蛋白質研究所編, 化学同人, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 網膜および/または光受容に関連する症状の改善または予防用医薬ならびに網膜および/または光受容に関連する症状を改善または予防する物質のスクリーニング方法

発明者: 古川貴久、茶屋太郎

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-194648

出願年: 平成 30 年

国内外の別: 国内

〔その他〕

大阪大学蛋白質研究所 分子発生学研究室ホームページ

http://www.protein.osaka-u.ac.jp/furukawa_lab

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。