

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16087

研究課題名(和文) 視細胞で光依存的・ロドプシン非依存的に起こるPKA活性変化の生理的意義とは？

研究課題名(英文) Physiological role(s) of light-dependent, rhodopsin-independent PKA activity change in retinal rod photoreceptor cells.

研究代表者

佐藤 慎哉 (SATO, Shinya)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：50814894

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)：多光子顕微鏡を使ったマウス網膜の蛍光ライブイメージングを行い、桿体視細胞が持つ第二の光応答、光OFFによるcAMP依存性キナーゼ (protein kinase A, PKA) 活性化を発見した。研究開始当初の予想を覆し、桿体の光受容タンパク質ロドプシン、およびGタンパク質トランスデュシンがPKA活性化に関与することが判明した。過去の知見とアルビノマウスでの測定から、光ON時にはドパミンによって桿体PKAが抑制されることも分かった。これらの結果から、光OFF時の急速なドパミン停止と、ロドプシンからの持続的な活性化シグナル入力統合され、見かけの光OFF活性化を形成するモデルを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ロドプシンは桿体視細胞の視覚光応答を司る光受容体で、1867年にキューネが報告して以来、生物学の広い範囲で研究され続けてきたモデルタンパク質である。ロドプシンの主要な機能は桿体cGMP分解を介した視覚光応答の惹起、これは我々の夜間視力を司る。私はロドプシンが、桿体が視覚機能を示す強度より10000倍以上強い光を受容した際、PKAを活性化することを示した。PKAはcGMPではなくcAMPで活性化される酵素である。つまり、ロドプシンの弱光でcGMPを分解する経路に加え、強光でcAMPを合成する第二経路が判明したと言える。本研究は、長い歴史を持つロドプシン研究に新たな方向性を示した。

研究成果の概要(英文)：Light OFF-induced activation of cAMP-dependent kinase (protein kinase A, PKA) was revealed by live fluorescent imaging using a multiphoton microscope, as a second photoresponse in rod photoreceptor cells. Rod photoreceptor molecule, rhodopsin, and G-protein transducin were shown to be a part of its molecular mechanism. Previous insights and my experimental data from albino mice suggests that light ON suppresses rod PKA via dopamine release into the intercellular space. Based on these data, I propose that light OFF quickly stops dopamine release to trigger the apparent PKA activation driven by persisting rhodopsin signal.

研究分野：視細胞の生物学

キーワード：視細胞 網膜 多光子顕微鏡 蛍光生体イメージング ロドプシン PKA cAMP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 視細胞 cAMP は注目度の低い研究対象だった。

ロドプシンは桿体視細胞の視覚応答を司る光受容タンパク質として広く知られているが、その下流で視細胞の電流応答を生じる仕組みについて、1970年代時点では Ca²⁺説、cGMP 説、cAMP 説など諸説混在する状態だった。この状態は 1985 年、ソ連の Fesenko らが当時実用期に入っていたパッチクランプ法を使い、桿体視細胞の形質膜上において cGMP 依存性陽イオンチャネルの存在を示したことで解決した。そして、その後の数十年の活発な研究の末に、ロドプシン活性化から cGMP 分解に至る光情報伝達経路と、その効率を調節する Ca²⁺という構図が明らかとなっていった。しかしその一方で、視細胞における cAMP の役割はさほど注目されなくなり、シナプス末端のギャップ結合ネットワークが示す日周リズムや、下等脊椎動物におけるミオイド部の伸縮に関する役割などが、少数のグループで研究される程度となっていた。

(2) 視細胞は蛍光ライブイメージングを行うことが困難な対象である。

Ca²⁺イメージングを始めとする蛍光ライブイメージング法は神経科学の分野が先導的な役割を示してきた。加えて光遺伝学の隆盛もあり、光観察・光操作技術は神経科学における最も主要な方法論となってきていた。しかしながら、対照的に網膜での適用例は多くなかった。なぜならば、桿体視細胞は一光子の光にも反応し得る究極の光感度を有しているがゆえに、一般的な蛍光励起光よりはるかに弱い光でも光応答が飽和に達し、機能を失うからである。これを克服した稀有な例として、ドイツのオイラーのグループが開発した系がある。彼らは励起光に赤外線レーザーを使う多光子顕微鏡、および顕微鏡システムと高速で同調する専用の光刺激システムを使って、網膜のスライス培養で、光感度が低い錐体視細胞を対象に、かつ、細胞の光感受性部分から最も離れた位置にあるシナプス末端を標的とすることで、Ca²⁺イメージングに成功している。しかし、それだけの工夫を凝らした系をもってしても、桿体からの光応答は報告されていなかった。

(3) キナーゼ活性を生きたマウス組織から観察する蛍光ライブイメージング法

GFP を代表とする蛍光タンパク質の発見と遺伝子導入技術の発展は、生体内の特定の細胞を光らせるという新たな解剖学的方法論を与え、観察の対象を固定切片から生きた細胞、組織、そして動物個体へと広げた。さらに Tsien や宮脇らが開発した、生体内の特定分子の濃度に応答して蛍光強度や色を変化させる改変蛍光タンパク質は、細胞の形のみならず、その中で働く様々な酵素や分子の動きを実際の現場で可視化するという、新たな生物学分野を切り開いた。その発展として、2011 年に小松らはリン酸化酵素キナーゼの活性を蛍光色変化に変換する人工タンパク質センサーを発表し、2012 年には上岡らが全身で同センサーを発現する遺伝子組換えマウスを発表した。そして 2018 年の本研究開始時点には、ERK、PKA、AMPK、S6K、ROCK など、細胞内で重要な機能を担う多様なキナーゼの動きを可視化するマウス系統群が整備されていた。

(4) 本研究計画申請段階で得られていた予備的な研究成果

上記の多数のマウス系統群から、光に応答して網膜内のキナーゼ活性変化が起こる系統のスクリーニングを行い、桿体視細胞 PKA 活性が変化することを見出ししていた。不思議なことに、野生型 PKAchu では PKA 活性化、アルビノ PKAchu では PKA 抑制が生じるという真逆の変化を観測していた。抑制の方は、既報から光依存的なドパミンの放出と、その下流で起こる視細胞ドパミン受容体 D4R の活性化で説明可能だったが、一方、活性化は説明できなかった。

2. 研究の目的

(1) 光による桿体 PKA 活性化を司る光受容体の同定。

光で PKA が活性化される現象の背後にある分子メカニズムは全くの不明であった。そこで最初に、責任光受容体の同定を目的とした。

(2) 刺激光の色・強さと PKA 活性変化効率の関係の分析。

光による PKA 活性化の特徴をより明確に記述するために、どのような色、強さの光で応答が惹起されるのかを分析することにした。

(3) PKA 活性化が桿体と錐体の暗順応に与える影響の分析。

桿体 PKA の標的タンパク質に関する複数の生化学的研究の文献において、PKA が視細胞光感度を上昇させる役割を持つと示唆されていた。言い換えると、PKA が暗順応を促進するという仮説があった。そこで、この仮説を生理学的な手法で検証することにした。

3. 研究の方法

(1) 多光子顕微鏡での PKAchu 網膜のライブイメージング。

電気生理学実験や網膜長期培養の文献を参考に、PKAchu 網膜を実体顕微鏡下での解剖で取

り出し、膜基材上に展開（フラットマウント）して、数時間の測定セッションの間に安定して灌流培養する方法を確立した。そして、水浸レンズを備えた多光子顕微鏡システムで網膜を観察した。光刺激実験では、光の色・強度・時間を調節可能な自作の LED 光刺激システムを用いて、対物レンズから刺激光を射出することで、網膜上に直径約 1 mm の光スポットを投射した。

(2) 分光光度計と高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた網膜内ロドプシンの定量。

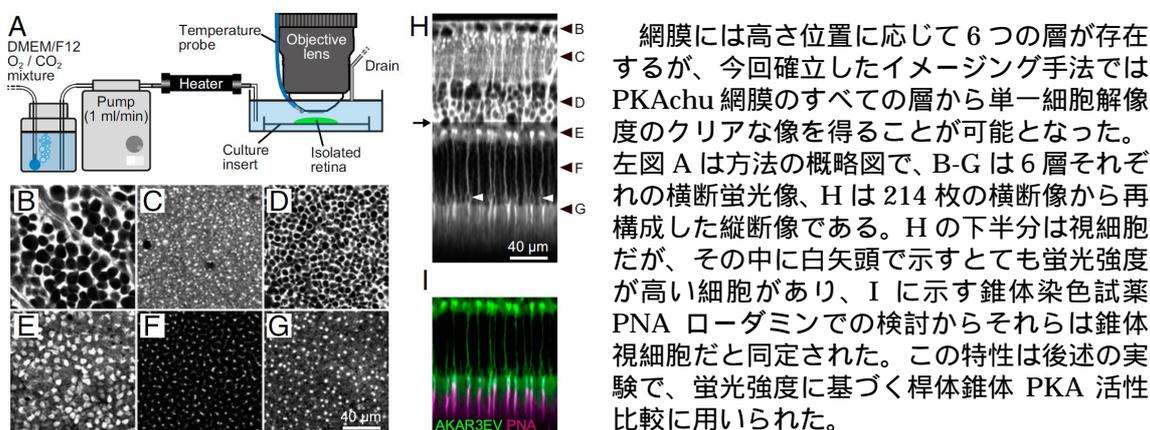
京都大学大学院理学研究科 生物物理学教室の山下先生のご協力をいただき、マウス網膜から抽出したロドプシン溶液から吸収スペクトルを測定し、光照射前後の差スペクトルに基づいてロドプシン量を精密に決定した。また HPLC でロドプシン内の発色団レチナールの立体異性体組成も分析した。

(3) 網膜視細胞の視覚光応答を測定する生体外網膜電図法（ex vivo ERG）。

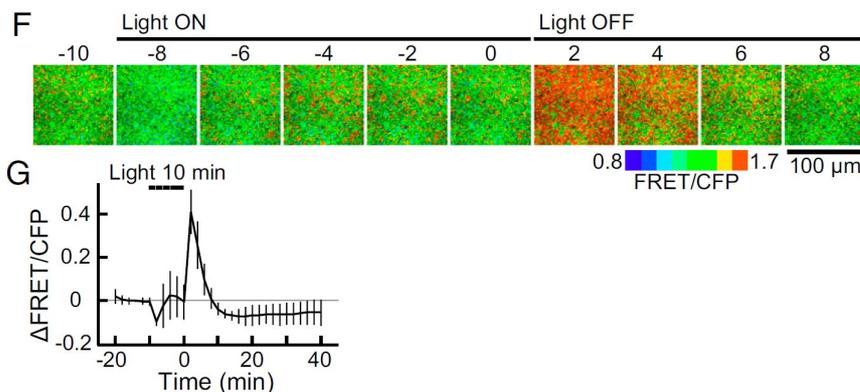
米国ユタ大学の Frans Vinberg や筑波大の櫻井啓輔博士の技術指導のもと、ex vivo ERG の実験系を構築した。京都大学大学院理学研究科 研究機器開発支援室に依頼し、灌流路と電極ポートを備えたアクリル製網膜ホルダーを製作した。ホルダーに網膜を固定し、灌流下でフラッシュ光刺激を行い、視細胞の光応答を測定した。応答電位は差動増幅器で増幅し、デジタイザーを介してコンピューターに取り込んで分析した。また、デジタイザーと付属の制御ソフトは、上述の光刺激装置と応答測定を同期させる用途にも使用された。

4. 研究成果

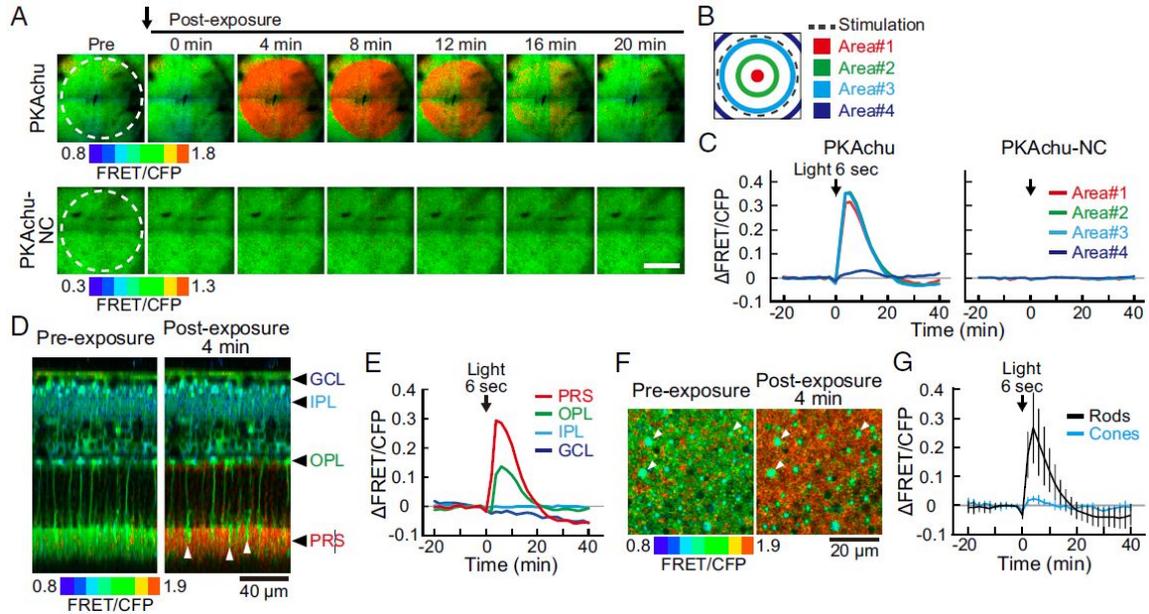
(1) PKAchu 網膜の多光子ライブイメージングは PKA 活性を一細胞解像度で描出した。



(2) PKA 活性化が光 OFF で誘導されることを示した。

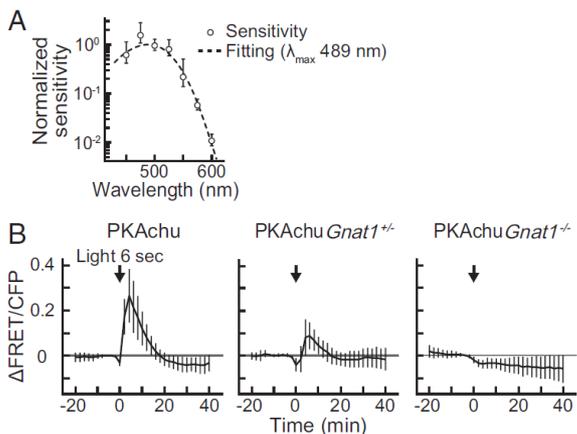


(3) 光 OFF による PKA 活性化は桿体視細胞でのみ生じていた。



A は刺激光スポット周辺の PKA 活性の時間変化を示し、PKAchu では光 OFF の 4 分後に PKA 活性化を検出した。一方、蛍光バイオセンサーを 1 アミノ酸だけ、PKA 標的アミノ酸のスレオニンアラニンに置換した PKAchu-NC 系統では全く変化は検出されなかった。B に示す 4 つの領域に画像を切り分けてグラフに示したのが C で、PKAchu では光スポット内における均一な活性化、外ではほとんど変化がないことが分かる。そして、PKAchu-NC ではどのエリアでも PKA 活性は変化していない。D では、再構成縦断像を分析して、網膜の下半分、視細胞でだけ PKA 活性化が起きたことを示す。矢頭で示す 4 つの高さの活性をグラフにしたのが E で、視細胞を含む OPL、PRS 層だけで活性化ピークが検出されている。D で PRS に活性化していない細胞がいくつかあったため、PRS の強拡大横断像を分析したのが F と G である。(1) で分かった高蛍光 = 錐体のパターンを基に、PKA が桿体でだけ活性化することを示した。

(4) 当初の予想を覆し、光による PKA 活性化はロドプシンに依存することが判明した。



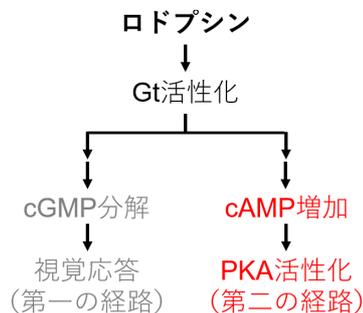
青色からオレンジ色光まで、7 色の異なる色の光で PKA の活性化を誘導し、その効率を比較したのが A の作用スペクトルで、そのピークは 489 nm に検出された。これは、別の実験で測定したロドプシンの吸収ピーク 495 nm とほぼ一致しており、PKA がロドプシンで活性化されることを強く示唆した。次に、*Gnat1*^{-/-} マウス(ロドプシンで活性化される G-タンパク質トランスデュシンの α サブユニットを欠損)を PKAchu と交配し、その子孫の PKA 活性をイメージングで測定したのが B である。コントロールの野生型(左)と比べ、*Gnat1*^{+/-} で応答減弱、*Gnat1*^{-/-} で消失を検出した。これらの結果から、ロドプシンとトランス

デュシンの PKA の活性化に必要であると結論した。なお、研究当初にロドプシン以外の光受容体と考えていたのは、光照射量とロドプシン褪色量の関係について、理解が不足していたことが原因と考えている。データは省略するが、その実証実験も行い、ロドプシン褪色に対する理解を深めた。

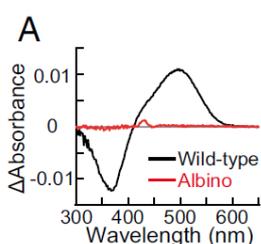
なお、上記の 495 nm というロドプシンの吸収極大は一般的に報告されている 500 nm よりもやや短い。その原因を検証するための分析と HPLC 測定も行い、イソロドプシンの生成が原因であると確定した。イソロドプシンが生じた原因は不明で、今後の研究課題となった。

(5) 光による PKA 活性化は、桿体の通常機能範囲の 10000 倍強い光を必要とした。

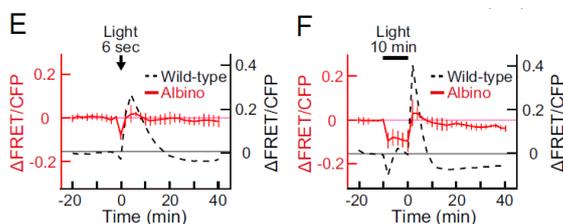
上記作用スペクトルの測定で得た光感度データから、光 OFF による PKA 活性化を引き起こすのに必要な光強度が 500 nm おいて約 1.0×10^8 photons μm^{-2} と判明した。これは少なく見積もっても、視覚光応答で必要とされる値より 10000 倍強い強度である。このことから、ロドプシンには弱光に反応して cGMP 分解を介した視覚光応答を生じる第一の経路に加え、強光に反応して cAMP 増加と PKA 活性化を引き起こす第二の経路が存在することを提唱する。



(6) アルビノ網膜で PKA が光で活性化されない原因はロドプシンの欠損で説明できた。

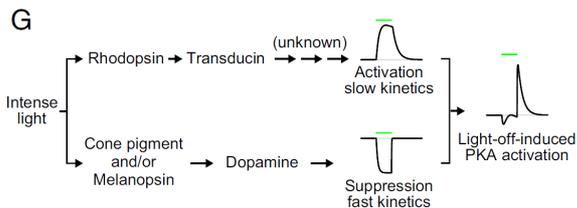


A は野生型とアルビノの網膜フラットマウント試料から抽出、測定されたロドプシンの吸収スペクトルの比較で、意外なことにアルビノではロドプシンが検出されなかった（赤線）。なお、この実験ではロドプシンの抽出操作以前を白色照明下、以降を赤色照明下、すなわちロドプシンが褪色しない条件で行っているが、すべての操作を赤色照明で行った場合はアルビノでも大きなロドプシンのピークを検出した。したがって、アルビノ網膜は白色光下での飼育と網膜フラットマウント操作の過程で光褪色によって失われたと解釈する。



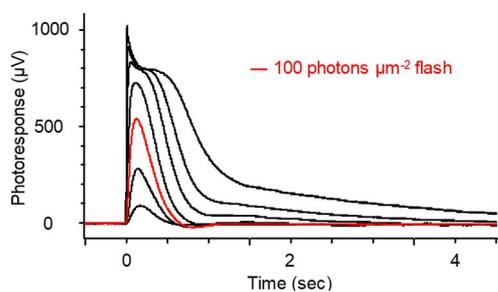
アルビノ網膜の PKA 光応答をイメージングした（赤線）。E は 6 秒、F は 10 分間の光刺激を与えたが、上向きのピークは全く検出されず、(4)のロドプシン仮説を追証できた。また、光 ON での抑制は明瞭に観測され、既報より錐体視物質、またはメラノプシンという網膜の他の光受容体の下流で起きる、ドパミンを介した PKA 抑制だと解釈した。

(7) 桿体 PKA 活性を制御するロドプシン-ドパミン統合モデルの提唱。



野生型では光 ON の間、ロドプシン駆動の活性化とドパミン駆動の抑制が同時に起きていると解釈できる。もしこれら 2 つの拮抗する系の作用にわずかな時間差があると考えれば、それらが統合されて生じる波形が (2) で見た 10 分刺激実験の結果をうまく説明できる。

(8) ex vivo ERG の測定系を確立したが、PKA の暗順応への寄与は分析未了となった。



ex vivo ERG システムを組み立て、試験的にマウス網膜のフラッシュ光応答を測定した。図は時間 0 で 2 ms の 500 nm フラッシュ光を照射して得た測定を重ね書きで、それぞれの波形は光強度を 3.2 倍ずつ変えながら測定された。PKA が暗順応に与える影響の検討について、期間中に論文発表できなかったが、予備的なデータを得た。

一方、米国の Kolesnikov らは 2019 年に、ロドプシンキナーゼ GRK1 の PKA 標的アミノ酸を一残基変異させたマウスで、暗順応遅延の表現型を報告した。彼らも PKA の影響が桿体特異的であることを示した。研究競争に遅れをとったと言えるが、本計画の方向性が正しかったことを確認できた。また、桿体視細胞内には GRK1 以外の PKA 標的が複数存在するので、研究の余地はまだ残っていると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Shinya, Yamashita Takahiro, Matsuda Michiyuki	4. 巻 117
2. 論文標題 Rhodopsin-mediated light-off-induced protein kinase A activation in mouse rod photoreceptor cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 26996 ~ 27003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2009164117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐藤慎哉、松田道行
2. 発表標題 光依存的、視細胞特異的なProtein kinase Aの一過的な活性化
3. 学会等名 異分野融合による次世代光生物学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤慎哉、松田道行
2. 発表標題 マウス視細胞で発見された光依存的なProtein kinase A 活性化の分子機構
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤慎哉、松田道行
2. 発表標題 マウスの桿体視細胞が光でProtein Kinase Aを活性化する仕組みは何なのか？
3. 学会等名 日本動物学会 近畿支部 研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤慎哉、松田道行
2. 発表標題 網膜の桿体視細胞で起こる光依存的なProtein kinase A活性化
3. 学会等名 新学術領域 Resonance Bio 平成31年度班会議 Buy me! Discover Resonance in the CHAOS
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato S, Matsuda M.
2. 発表標題 Light-OFF induced protein kinase A activation in mouse rods.
3. 学会等名 FASEB Science Research Conferences. The Biology and Chemistry of Vision (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato S, Yamashita T, Matsuda M.
2. 発表標題 Detect with PKAchu: Light-off-induced PKA activation in rod photoreceptor cells.
3. 学会等名 44th Meeting of Australian Society for Biophysics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤慎哉、櫻井啓輔.
2. 発表標題 網膜の光応答を測定する ex vivo ERG 測定系の構築.
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤慎哉、山下高廣、松田道行.
2. 発表標題 Rhodopsin-mediated Light-off-induced Protein Kinase A Activation in Mouse Rod Photoreceptor Cells. (邦題: マウス桿体視細胞においてロドプシンを介するが光オフで生じるプロテインキナーゼAの活性化)
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山下 高廣 (YAMASHITA Takahiro)	京都大学・大学院理学研究科・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------