

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570069

研究課題名(和文) 昆虫の視物質回路網の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the visual cycle in the insect retina

研究代表者

尾崎 浩一 (OZAKI KOICHI)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90194539

研究成果の概要(和文)：昆虫の網膜における視物質発色団の代謝経路について、(1)光により11-シス形レチノイドを生成する蛋白質の同定と、(2)不完全変態昆虫における発色団代謝経路の解明とそれに関与する蛋白質の同定、の2点に焦点を絞り研究を行った。その結果、ショウジョウバエの網膜特異的酸化還元酵素(PDH)が光異性化蛋白質であることを見出した。また、コオロギの発色団代謝経路をHPLC解析により明らかにし、それに関与するレチノール結合蛋白質を発見した。

研究成果の概要(英文)：The metabolic pathway of visual chromophore in the insect retina has been investigated with particular focus on the following subjects, (1) identification of the protein that isomerizes all-trans retinoid to 11-cis form by light, and (2) metabolic pathway of the chromophore in the hemimetabolous insect. Researches in this project have elucidated that PDH, previously identified as a retina-specific oxidoreductase, is a strong candidate for a retinoid photoisomerase. In addition, HPLC-analyses of retinoid compositions in the light- and dark-adapted retinas of crickets uncovered their visual cycle and a novel protein involved in the cycle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：視物質, 視物質回路, 昆虫, レチノイド, 異性化, 網膜, 視細胞, コオロギ

1. 研究開始当初の背景

光の豊富な環境下で生活する動物にとって、視覚は環境情報を入手するための最も重要な手段であり、その入力経路に生じた障害は、摂食、逃避、生殖など多くの動物行動に重大な影響を及ぼす。すべての動物において、光を最初に受容し視覚情報の入口となるのが視物質である。視物質は蛋白質であるオプ

シンと、それに結合して可視光の吸収を可能にする発色団(11-シスレチナル)からできており、そのいずれに異常が生じても、正常な視覚機能を維持することができない。ヒトにおいては、発色団代謝系(visual cycle)に関与する遺伝子の異常が重篤な視覚障害を引き起こすことが近年になって次々と明らかにされ、それらがコードする蛋

白質の機能解析を通じて、発色団の代謝経路の解明が急速に進展してきた。しかし、視覚システムの生物学的な理解を進め、その進化や起源、環境への適応を探求する上では、視物質の合成、代謝系を様々な動物において明らかにし、比較検討することが極めて重要である。蛋白質であるオプシン自身の分子進化に関しては、既に数多くの知見が積み重ねられてきているのに対し、その合成・輸送系や発色団の代謝経路に関する研究は、まだ、その端緒にすぎたばかりであり、特に昆虫をはじめとする無脊椎動物での研究の進展が期待されている。

我々は、ショウジョウバエにおいて、発色団の供給とオプシンの合成・輸送が密接に関係することを発見して以来、視物質合成の機構について精力的に研究を行ってきた。オプシンの合成・輸送に関しては、小胞輸送を制御する Rab 蛋白質の変異体を用いた輸送経路の解析を行い、更に、蛋白質構造やそれに付加する糖鎖の重要性についても指摘した。また、発色団代謝に関する全トランスレチノールを 11-シス形に光異性化する蛋白質(レチノクロム)に関する研究を発端に、網膜でレチノイドを結合し、発色団代謝に関与するレチノイド結合蛋白質を軟体動物や昆虫など種々の動物において発見し、その機能解析を行ってきた。一方、米国を中心にショウジョウバエ変異体を駆使したレチノイド代謝の研究が最近になって急展開し、代謝経路に含まれる可能性のある蛋白質が次々と同定されつつある。しかしながら、visual cycle の鍵酵素となる光異性化蛋白質や、細胞間でのレチノイドの運搬を司るレチノイド結合蛋白質など、網膜内で機能する重要な蛋白質についてはまだ同定されていないのが現状である。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では国内外の知見が最も集積しているショウジョウバエを当初の材料として用い、更に、従来全く研究がおこなわれてこなかった不完全変態昆虫を研究対象に加えることにより、昆虫の visual cycle の更なる解明を目指す。

Visual cycle において最も重要なステップは、全トランス形のレチノイドを 11-シス形に異性化する反応である。ショウジョウバエには、光依存的に 11-シス形を生成する経路が存在することは知られているが、その経路の分子過程や、関与する蛋白質については明らかにされていない。また、脊椎動物等の研究から、visual cycle の主要な経路は視細胞に隣接する色素細胞内に存在し、細胞間に局在するレチノイド結合蛋白質を介して視細胞へ発色団を供給していることが知られている。昆虫の視細胞も色素細胞により取り

まれており、色素細胞-視細胞間で発色団を輸送する蛋白質が、visual cycle において重要な役割を担っていることが示唆されている。そこで、これらの代謝過程(「光異性化過程」と「細胞間輸送過程」)に関与する蛋白質を同定し、visual cycle の重要な空白を埋めることを、本研究の第 1 の目的とした。

従来の昆虫の visual cycle に関する研究は、ほとんど全てが完全変態昆虫を用いて行われており、不完全変態昆虫に関する知見は極めて乏しい。しかしながら、visual cycle の進化や、発生段階に伴う変化を明らかにする上では、これらの昆虫に関する研究が不可欠である。そこで、不完全変態昆虫の網膜におけるレチノイド代謝経路の解明と、それに関わる蛋白質を同定することを、本研究の第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエの visual cycle 関連蛋白質の同定

研究の実施に先立ち、まず、従来の研究成果に基づいて作成したショウジョウバエにおけるレチノイド代謝マップ(図 1)を以下の通り提案する。図中で青字は、既にショウジョウバエで同定された蛋白質を示してい

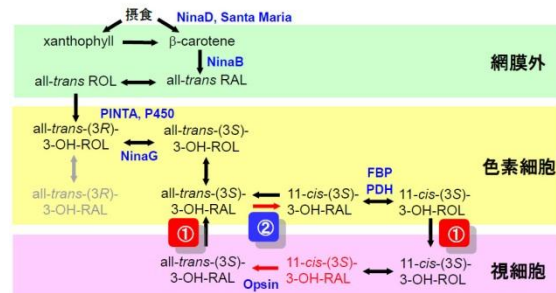


図 1. ショウジョウバエにおけるレチノイド代謝マップ

る。経口的に摂取されたカロテノイドは全トランスレチノール (all-trans ROL) に変換されて、眼に運ばれる。網膜内では、色素細胞においてレチノールの水酸化酵素や水酸基転移酵素が同定されており、脊椎動物と同様、色素細胞が visual cycle の活動に重要な役割を担っていることが示唆されている。本研究で同定を目指す光異性化酵素 (ステップ ②) も、色素細胞に存在することが予測される。色素細胞で生成された 11-シスレチノイドは結合蛋白質により視細胞に輸送される (ステップ ①)。

光異性化酵素の同定にあたっては、これまでにセイヨウミツバチで発見されている水溶性の光異性化蛋白質を手掛かりとした。この蛋白質は生化学的に単離・精製されているものの、その 1 次構造等については不明のまま残されていた。そこで、本研究では、ミツバチから精製した異性化蛋白質について PMF 法により 1 次構造を決定し、その配列との相

同性から、ショウジョウバエの異性化酵素の検索を行った。

一方、レチノイド結合蛋白質については、以下の方法による同定を試みた。これまでに知られている結合蛋白質のいくつかは、レチノイドの有無によりその発現量が変化する。そこで、ショウジョウバエをレチノイド欠乏培地で飼育して、発現が抑えられる蛋白質を検出し、PMF 法による同定を試みた。

(2) 不完全変態昆虫における visual cycle の解析

不完全変態昆虫のモデルとして、飼育が容易で生理学的な知見が豊富なフタホシコオロギを材料に用いた。この動物は、近年、分子遺伝学的な知見や技術の発展も著しく、visual cycle の分子レベルでの解析にも大きく寄与することが見込まれる。

まず、コオロギの明暗順応に伴って起こる、網膜中のレチノイドの組成変化を HPLC により解析し、レチノイドの代謝経路を推定した。次にレチノールの蛍光を指標に、網膜に含まれる水溶性のレチノイド結合蛋白質の検出を行い、visual cycle におけるその蛋白質の機能解析を試みた。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエの visual cycle 関連蛋白質の同定

セイヨウミツバチ網膜においてレチナールの光異性化に関与するレチノイド結合蛋白質を、網膜の水溶性画分からネイティブ電気泳動により分離し、PMF を用いた一次構造の解析を行った。その結果、最も有力な候補蛋白質として、「プロスタグランジン脱水素酵素類似蛋白質」が同定された。そこで、この配列を用いてショウジョウバエのゲノムデータを解析したところ、既に我々が単離・同定に成功し、色素細胞に特異的に存在することが明らかとなっている網膜特異的酸化還元酵素 (PDH) が、最もホモロジーの高い蛋白質として検出され、この蛋白質が、ショウジョウバエ網膜の visual cycle において、全トランスレチナールの光による 11-シス形への異性化に寄与していることが、強く示唆された。PDH は、レチナール-レチノールの酸化還元反応にも関与することが示されており、今回の結果は、この蛋白質が昆虫網膜の visual cycle においてきわめて重要な役割を果たしていることを示すものである。これまで、カロテノイドをレチノイドに分解する反応に併せて、暗所で異性化を引き起こす蛋白質は見つかっているが、酸化還元酵素が同時に光異性化に関与することが示された例はなく、世界的にも初めての発見である。次に、この蛋白質の生体内での機能を確認するために、PDH 欠損変異体の作成を行った。

FLP/FRT による組換えシステムを用いた染色体欠失法を利用することにより、PDH 遺伝子のみを特異的に欠損させた変異体の作成に成功し、PDH 蛋白質が全く発現されないことを、免疫ブロッティング法により確認した。この変異体の機能解析が、今後の課題である。

一方、ビタミン A 欠乏培地 (VA-) で飼育することにより、その発現量が変化する蛋白質について、2次元電気泳動法による分離と質量分析を用いた PMF 分析を試みた。その結果、VA- 条件での飼育により発現量の減少する分子量約 37k の蛋白質を、2次元電気泳動により分離すること成功した (図 2、矢印)。

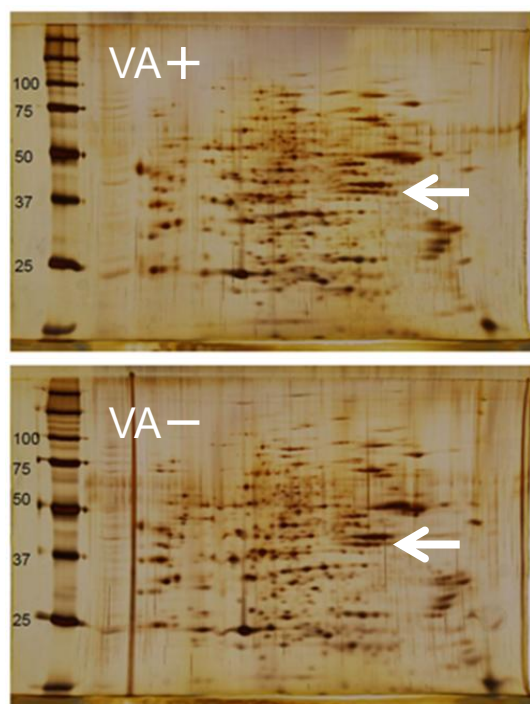


図 2. 通常培地 (VA+) とビタミン A 欠乏培地 (VA-) で飼育したハエ網膜水溶性画分の 2次元電気泳動。矢印は VA- で減少する蛋白質

この蛋白質は、後述のコオロギ網膜水溶性画分で見出されたレチノール結合蛋白質と分子量が類似しており、レチノイドを結合することにより visual cycle で何らかの役割を担っていることが示唆される。そこで、2次元電気泳動で分離したスポットを切り出し質量分析を行ったが、同定に十分な信号が得られず、今後の解析には更なる量が必要であることが分かった。

2. 不完全変態昆虫における visual cycle の解析

コオロギの網膜におけるレチノイドの代謝経路を解析し、その visual cycle を解明するため、明・暗順応に伴う網膜中のレチノイド組成の変化を、HPLC により分析した (図 3)。まず、暗順応したコオロギの網膜中に

は、視物質の発色団である 11-シスレチナールに加え、全トランス形のレチノールが含まれていることが分かった。これに白色光を照射すると、視物質の光吸収に伴って発色団レチナールの一部は全トランス形に異性化されたのに対し、全トランス形のレチノールは反対に 11-シス形に変化した。この結果は、コオロギの visual cycle にもショウジョウバエと同様レチノールが関与していることを示唆している。

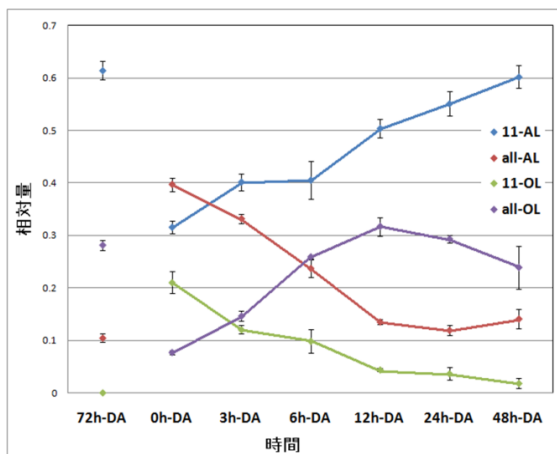


図3. 明・暗順応に伴うコオロギ網膜中のレチノイド組成変化

次に、明順応したコオロギを暗所に置き、その後のレチノイド組成変化を追ったところ、視物質の光反応により生じた全トランスレチナールは減少し、代わって全トランス形のレチノールが増加した。また、光照射に用生じた 11-シスレチノールも減少しレチナールへと酸化されることも分かった。

これらの結果から、光照射後に生じた全トランス形の視物質発色団は、一旦レチノールに還元されて輸送・貯蔵されること、また、このレチノールは、光により直接あるいはレチナールを介して 11-シス形に異性化され、再び視物質の発色団として供されることが明らかとなった。ショウジョウバエを含む他の動物の知見から、こうしたレチノイドの光異性化、酸化還元反応には、視細胞に隣接する色素細胞が関与している可能性が高いと考えられる。

コオロギの visual cycle においても、レチノールが重要な成分となっていることが明らかになったので、これに関与するレチノール結合蛋白質の同定とその機能解析を試みた。コオロギ網膜の水溶性画分をネイティブ電気泳動により分離し、紫外線照射により生ずる蛍光を手掛かりにしてレチノール結合蛋白質を検出したところ、分子量約 36k の蛋白質を見出した。HPLC による解析から、この蛋白質は暗所で全トランス形レチノールを結合しており、光照射により結合するレチ

ノールが 11-シス形に変化することが示された。今後、この蛋白質を電気泳動法等を用いて単離・精製し、その生化学的性質、1次構造等を明らかにし、in vitro での蛋白質発現や RNAi 法による in vivo 発現抑制などにより、その機能を解明する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Satoh AK 他 5 名, Arrestin translocation is stoichiometric to rhodopsin isomerization and accelerated by phototransduction in *Drosophila* photoreceptors, *Neuron*, 査読有, 67 巻, 2010, 997-1008.
- ② Liu CH, Satoh AK 他 4 名, Ca²⁺-dependent metarhodopsin inactivation mediated by calmodulin and NINAC myosin III, *Neuron*, 査読有, 59 巻, 2008, 778-789.
- ③ Satoh AK 他 3 名, Calcium-activated Myosin V closes the *Drosophila* pupil, *Current Biology*, 査読有, 18 巻, 2008, 951-955.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 尾崎浩一, ショウジョウバエのレチノイド代謝, 第 11 回光生物シンポジウム, 2010 年 10 月 9 日, 島根大学隠岐臨海実験所 (島根県隠岐の島町)
- ② 岩谷和徳, フタホシコオロギ網膜における視物質発色団の代謝経路, 日本動物学会第 81 回大会, 2010 年 9 月 23 日, 東京大学教養学部 (東京都目黒区)
- ③ 稲垣 壮, 2D-DIGE によるショウジョウバエ色素顆粒に局在する蛋白質の探索, 日本動物学会第 81 回大会, 2010 年 9 月 23 日, 東京大学教養学部 (東京都目黒区)
- ④ 尾崎浩一, Lipophilic ligand-binding proteins: Indispensable tools for in vivo utilization of lipophilic substances, 日本比較生理生化学会第 32 回大会, 2010 年 7 月 17 日, 九州産業大学 (福岡市)
- ⑤ 尾崎浩一, 甲殻類十脚目複眼の比較生理生化学, 日本比較生理生化学会第 31 回大会, 2009 年 10 月 23 日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)
- ⑥ 尾崎浩一, ズワイガニ複眼に含まれるカロテノイド色素について, 日本動物学会第 80 回大会, 2009 年 9 月 17 日, 静岡グランシップ (静岡市)
- ⑦ 原田綾乃, アフリカツメガエル胚の解離胚細胞の空間的再配置における細胞運動

性，日本動物学会第 80 回大会，2009 年 9 月 17 日，静岡グランシップ（静岡市）

- ⑧ 尾崎浩一，ショウジョウバエ頭部における性特異的な蛋白質の発現，日本動物学会第 79 回大会，2008 年 9 月 7 日，福岡大学（福岡市）
- ⑨ 尾崎浩一，昆虫網膜におけるレチノイド代謝とロドプシン合成，大阪大学蛋白質研究所セミナー，2008 年 4 月 19 日，大阪大学（大阪府吹田市）

〔図書〕（計 2 件）

- ① 尾崎浩一，共立出版，動物の動きの秘密にせまる，2009 年，238
- ② 石川 統，東京化学同人，生物学辞典，2010 年，1615

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 浩一 (OZAKI KOICHI)
島根大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：9 0 1 9 4 5 3 9

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐藤 明子 (SATO AKIKO)
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：3 0 5 2 9 0 3 7