

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700350

研究課題名（和文）

錐体視細胞に高い時間分解能と広いダイナミックレンジをもたらす分子機構の解析

研究課題名（英文） Analysis on the molecular mechanisms of wider dynamic range and higher time-resolution in cone photoreceptor cells.

研究代表者

橘木 修志（TACHIBANAKI SHUJI）

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：70324746

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物の網膜には、桿体、錐体の2種類の視細胞が存在する。錐体は、桿体と比べると、より高い時間分解能で光の強度変化をとらえることが出来る。また、処理できる光刺激強度の範囲が広い（ダイナミックレンジが大きい）。本研究では、その仕組みについて解析を行った。その結果、錐体では、応答形成に関わる活性型タンパク質の不活性化がより速く生じることや、酵素の活性調節がより大幅に行われていることが明らかになった。これらの違いが、錐体に特徴的な応答をもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In vertebrate retina, there are two types of photoreceptor cells, called rods and cones. The time resolution of cone mediated vision is higher than that of rod-mediated vision. This higher time-resolution depends on shorter responses of cones. It is also known that the range of light-intensity that cone can mediate is wider than that of rod. In this study, the underlying mechanisms of cone-specific responses are studied. The results show that the lifetime of activated enzymes, working in the phototransduction mechanism, are shorter in cones than in rods. And It is also revealed that the enzymatic activities in the phototransduction mechanism are more highly modulated in cones than in rods. These findings show molecular bases of the cone specific photoresponses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：視細胞、錐体、GRK、Sモジュリン、順応、RGS9

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の視覚系では、感度の異なる二種類の光検出細胞（視細胞）が併用されている。二種類の視細胞は、それぞれ錐体、桿体と呼ばれる。錐体は感度が低いので明るいところでの視覚を司り、桿体は感度が高いので薄暗いところでの視覚を司る。

錐体と桿体では、光刺激を細胞応答に結びつける酵素反応カスケード（以下、光シグナル変換機構と呼ぶ）が相同であることはよく知られている。しかし、錐体・桿体の光に対する応答（光応答）の時間分解能は大きく異なっており、錐体のほうが桿体よりも高い時間分解能を有している。

また、桿体とくらべると、錐体の方がより幅広い光強度で働くことが出来る。すなわち、ダイナミックレンジが広い。

このような違いがあることはよく知られており、古くから興味が持たれていたが、桿体と錐体で応答の仕方が異なる原因を明らかにするには、桿体と錐体の両方について、応答の形成や終息に関わる酵素とその反応を網羅的に解析し、両者の間で何が異なるのかを知る必要がある。ところが、桿体が比較的容易に大量精製できたのに対して、錐体は精製することが出来なかった。このため、両者を同レベルで比較・解析することが出来ず、原因の解明は不可能であった。

このような状況にあって、申請者らは、世界で初めて魚類（コイ）の網膜から桿体と錐体とを大量に分離精製することに成功していた(Tachibanaki et al, PNAS, 2001)。これにより、なぜ錐体と桿体とで性質が異なっているのかを、生化学的な手法により直接検討することが初めて可能になった。申請者らの初期の検討により (Tachibanaki et al, PNAS 2001, 2005)、錐体では桿体と比べて光シグナル変換機構での信号の増幅が小さいことが明らかになり、このことが錐体の光感度が桿体よりも低い一因であることが示唆された。また、活性型光受容蛋白質の不活性化が錐体では桿体よりも著しく速いことが明らかになり、このことが錐体の高い時間分解能をもたらしていることが示唆された。そこで、これらの初期の研究結果に立脚し、錐体が高い時間分解能をもつ分子メカニズム、錐体が桿体よりも広いダイナミックレンジを持つ分子メカニズムについてさらなる解析を試みたのが本計画である。同様の試みは、

研究計画を立案した時点ではほとんどなく、独創性の高い研究が期待された。

## 2. 研究の目的

本研究では、錐体と桿体の精製試料がコイ網膜から得られる方法を確立したメリットを生かし、(1) 錐体に高い時間分解能をもたらす分子メカニズムと、(2) 錐体が広いダイナミックレンジを持つ分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

(1) 錐体に高い時間分解能をもたらす分子メカニズムには、いくつかの候補が考えられるが、その中で、特に、活性型視物質の不活性化が錐体で速く生じる仕組み、活性型トランスデューシンの不活性化が錐体で速く生じる仕組み、および錐体における高効率 cGMP 合成について解析することにした。さらに、なぜ活性の違いが生じているのか、その分子的な基盤を検討することにした。

(2) 錐体が広いダイナミックレンジを持つ分子メカニズムについては、申請者は視細胞の順応機構の効率が錐体と桿体とで異なるのかを調べることでアプローチをすることにした。視細胞の順応機構としては、活性型視物質を不活性化する反応の調節機構と、セカンドメッセンジャーの合成反応の調節機構が知られている。そこで、これらの調節機構の効率が錐体と桿体とで異なるのかどうかを調べることにした。さらに、錐体において、強い光環境下でも視物質が枯渇しない仕組みを明らかにするため、錐体と桿体でのレチナール代謝の効率の違いを検討した。

## 3. 研究の方法

### 錐体・桿体における酵素反応効率の測定

錐体と桿体のなかでの種々の反応の効率を測るため、まず、錐体・桿体をコイ網膜から精製した。次に、それぞれの細胞の破碎標本を調製し、それぞれにおいて特定の酵素の反応の効率がどの程度であるか、生化学的な手法により計測した。

### 酵素の定量

錐体と桿体とで特定の反応の効率に有意な違いが観測された場合、原因として、反応を触媒している酵素の量が違う場合と、酵素の触媒効率（酵素の質）が違う場合の2通りの可能性がある。

そのどちらかを検討するため、細胞内に含まれる各種酵素の定量を行った。定量は、定量的なウェスタンブロッティング法、および免疫細胞染色法を組み合わせで行った。

### 蛋白質の発現

桿体型、錐体型の酵素活性の測定を細胞内成分でなく精製酵素単体で行った方がよい場合や、上記の定量的ウェスタンブロッティン

グ法を行う際に基準量物質として特定の蛋白質が必要であり、かつ、細胞からの精製量では実験が困難な場合には、大腸菌、昆虫細胞、もしくはヒト培養細胞を用いた蛋白質発現系による目的蛋白質の大量発現・精製を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 錐体に高い時間分解能をもたらす分子メカニズムについての解析

錐体の応答は、桿体の応答と比べると素早く終息する。このため、錐体を使っているのを見ているときは、桿体を使っているのを見ているときと比べて、我々は高い時間分解能で刺激の変化を追うことが出来る。より高い時間分解能を視覚にもたらすには、視細胞の応答をより速く終息させる機構があることが必須である。

視細胞の応答が引き起こされる仕組みは三量体G蛋白質共役型酵素カスケードの一種である光シグナル変換機構である。この仕組みでは、一連の酵素反応により、光刺激が細胞内のセカンドメッセンジャーであるcGMPの分解を引き起こす。そのため、光依存的に細胞内cGMP濃度が減少し、結果として細胞膜上のcGMP依存性チャネルが閉鎖し、過分極性の応答が生じるに至る。

この仕組みで生じた応答を終息させるためには、活性化された光シグナル変換機構を速やかに停止し、さらに、減少したcGMP濃度をもとのレベルに戻す必要がある。前述のように、錐体の光応答は、桿体と比べて速く終息する。このことから、上記の2ステップ（光シグナル変換機構の停止と、cGMPの濃度回復）が錐体では桿体よりも速やかに生じる必要があると予測される。そこで、この予想が正しいかどうかを検証した。

本研究をスタートさせる前段階で、すでに我々は光シグナル変換機構の入り口である光受容タンパク質（視物質）の不活性化（リン酸化）が錐体では速いことを見いだしていた。これに加えて、本研究では、光シグナル変換機構のなかで働く三量体G蛋白質（トランスデュシン、以降Gtと略記）の不活性化が速いことを見いだした。さらに、cGMPの合成が錐体では桿体と比べて高いことが解った（Takemoto et al., 2009）。これにより、当初の予想が正しいことが確認された。

そこで、次に、どのような分子メカニズムによって錐体では桿体と異なる効率で反応が生じるのかを検討した。

視物質がリン酸化によって不活性化される効率が錐体で高い理由としては、すでに我々は解析を行っており、錐体型の視物質キナーゼが桿体型視物質キナーゼよりも高い触媒活性を持つこと、さらに、錐体型キナーゼのほうが桿体型のキナーゼよりも高濃度

で存在することの2つが理由であることをすでに報告済みであった。そこで、錐体型の視物質キナーゼがなぜ桿体型のものに比べて活性が高いのかを、錐体型・桿体型キナーゼのキメラを用いた実験で検討した。その結果、C末端部位近傍の20アミノ酸残基からなる領域が活性の違いをもたらしていることを示す結果を得た（学会発表済）。この領域は、基質である視物質のリン酸化部位（C末端領域）に結合する部位の周辺と考えられる。おそらく、基質結合ポケットの形状に影響をおよぼし、その結果、基質に対する親和性が変わるのだろうと考えられる。

また、我々は、なぜ錐体ではGtの不活性化が速いのか、そのメカニズムについても検討を行い、細胞内に発現しているGAP蛋白質（RGS9と呼ばれる）の発現量の違いにほぼ依存していることを示す結果を得ている（現在投稿準備中）。

さらに、錐体での速いcGMP合成活性は、合成酵素の発現量の違いによっていることを見いだした。

##### (2) 錐体が広いダイナミックレンジを持つ分子メカニズムについての解析

錐体は、桿体と比べてより幅広い光強度で光刺激の強弱の差を検出することが出来る。これは、錐体の順応機構が、桿体と比べて、より効率よく働くことが一因と成っている。視細胞の順応は、視細胞のセカンドメッセンジャーであるcGMPの合成反応と、光依存的に生じる分解反応（光シグナル変換機構）のそれぞれの効率が、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度依存的に制御されることで生じることがこれまでの研究から解っている。

cGMP分解系をCa<sup>2+</sup>濃度依存的に調節する蛋白質としては、S-モジュリン（桿体型。錐体型はビジニン）が知られている。S-モジュリンは、視物質の不活性化を行う視物質キナーゼの活性をCa<sup>2+</sup>濃度依存的に調節することにより、順応を引き起こすと考えられる。錐体と桿体とでは、この調節のCa<sup>2+</sup>濃度依存性や程度が異なっていることが予想されたことから、我々はそれがどれくらい異なるのかを測定し、錐体での高効率の順応を説明できるかどうか検討した。その結果、錐体では、桿体と比べて、S-モジュリン/ビジニンが調節する視物質キナーゼ活性の幅は、錐体で桿体の100倍であることがわかった。このようなより広い調節幅を持っていることが、錐体のより広いダイナミックレンジの一因であると考えられる（現在投稿中）。

順応を担うもう一つのメカニズムであるcGMP合成系をCa<sup>2+</sup>濃度依存的に調節する蛋白質としては、GCAP(Guanylate cyclase activating protein)と呼ばれる蛋白質が知

られている。この蛋白質は、cGMP 合成酵素 (GC, Guanylate cyclase) の活性を調節している。錐体・桿体のダイナミックレンジの違いが、GCAP の働きのちがいによってもたらされている可能性があったので、その効果を解析した。コイの視細胞に存在する GCAP を網羅的にクローニングし、それぞれの視細胞での発現量を定量した。また、それぞれの GCAP の組み替え蛋白質を用いて、それぞれの GCAP が GC を活性化する際の生化学的なパラメータを求めた。次に、これらの結果を合わせて、実際に細胞中でどの程度 GCAP が GC の活性を制御しているのかを推測した。その結果、GC の調節幅は錐体では桿体の 10 倍近いことが解った。このことも錐体のダイナミックレンジが広い一因と成りうる (Takemoto et al, 2009)。

以上の 2 つの順応に関わる要因に加え、ダイナミックレンジが錐体でより大きいことを保証するもうひとつのメカニズムを見いだした。我々は、錐体での視物質再生に関わる反応活性が桿体と比べて非常に高いことを見いだした (Miyazono et al, 2008)。

脊椎動物の視物質は、可視光を吸収するために、発色団として 11-cis retinal を共有結合している。光を吸収すると、11-cis retinal が all-trans retinal に異性化し、これをきっかけに視物質が活性型となって光シグナル変換機構が活性化されることになる。その後、しばらく時間が経つと、all-trans retinal は蛋白質部分から解離する。発色団を失った視物質が、再び光を受容して光シグナル変換機構を活性化できるようにするためには、11-cis retinal が蛋白質部分に再結合することが必要である。そのために、網膜には、視物質から解離した all-trans retinal を 11-cis retinal へと再生する。我々は、この再生を行うメカニズムの一連の反応の一部 (all-trans retinal の還元) が、錐体では桿体よりも速やかに進行すること、さらに、錐体でのこの反応は、発色団である 11-cis retinal を 11-cis retinol から合成する反応と共役していることを見いだした (Miyazono et al, 2008)。このことは、11-cis retinal 再生が錐体ではよりスムーズに進行すること、これにより視物質の再合成がスムーズに進行することを意味する。このことは、視物質をより激しく消耗するより明るい光環境において、錐体では視物質の枯渇が生じにくくなることを示唆している。以上のことから、今回発見された錐体特異的な retinal 再生反応機構は、より幅広い光強度で錐体が働く上で重要であると考えている。

以上、錐体に高い時間分解能をもたらす分子メカニズム、広いダイナミックレンジ

をもたらす分子メカニズムについて、おもに生化学的な解析を行い、しかるべき成果をおさめることが出来た。

生化学的な側面以外にも、細胞の形状の差が錐体・桿体の応答の違いをもたらしている可能性も考えられることから (Kawamura & Tachibanaki, 2008)、今後は、遺伝子改変動物などを用いたアプローチでその側面を検討してみることが重要かと考えている。

なお、視細胞の応答形成機構は、歴史的に三量体 G 蛋白質介在性情報伝達系のモデルのひとつであるので、今回得られた結果は、視細胞のみならず、他の同様の系を理解する上でも重要な知見となりうる。今後、GPCR を受容体とした三量体 G 蛋白質介在性情報伝達系の理解は、現在のリストアップの積み重ねの段階からそれぞれの刺激応答様式を問題とする段階へとすすんで行くのではないかと考えているが、その際に、本研究の結果が一つの道標となりうることを期待している。

## 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 4 件)

① Takemoto, N., Tachibanaki, S., and Kawamura, S. (2009) High cGMP synthetic activity in carp cones., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 106 (28), pp. 11788-11793, 査読有.

②, S., and Tachibanaki, S. (2008) Rod and cone photoreceptors: molecular basis of the difference in their physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. Vol. 150 (4), pp. 369-377, 査読有.

③ Torisawa, A., Arinobu, D., Tachibanaki, S., and Kawamura, S. (2008) Amino Acid Residues in GRK1/GRK7 Responsible for Interaction with S-modulin/Recoverin. *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 84(4) pp. 823-830, 査読有.

④ Miyazono, S., Shimauchi-Matsukawa, Y., Tachibanaki, S., and Kawamura, S. (2008) Highly efficient retinal metabolism in cones. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(41) pp. 16051-16056, 査読有.

[学会発表] (計 2 件)

① 瀬野 亜希、竹本 訓彦、橋木 修志 (発

表者)、河村 悟  
2 種類の視物質キナーゼ (GRK1、GRK7) の活  
性の違いをもたらす領域の特定  
於日本生物物理学会第 4 7 回年会  
2009 年 10 月 31 日  
アスティとくしま

②橘木修志 (発表者)、越谷 祐貴、河  
村 悟  
錐体特異的なGt活性化と不活性化をもた  
らす分子基盤  
於日本生物物理学会第 4 6 回年会  
2008 年 12 月 4 日  
福岡国際会議場

[その他]  
ホームページ等

[http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/kg-porta  
l/aspi/RX0011D.asp?UNO=10680&seq=55  
890](http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/kg-porta<br/>l/aspi/RX0011D.asp?UNO=10680&seq=55<br/>890)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橘木 修志 (TACHIBANAKI SHUJI)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授  
研究者番号：70324746

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし