

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570085

研究課題名(和文) 錐体・桿体視細胞に特異的な光応答をもたらす分子環境の解析

研究課題名(英文) Analysis on molecular environments that bring cell-specific photoresponses to rod and cone photoreceptors.

研究代表者

橘木 修志 (TACHIBANAKI, Shuji)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：70324746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の網膜には、錐体と桿体の2種類の視細胞が存在する。錐体は明るいところで、桿体は暗いところで働く。このことに対応して、錐体と桿体の光に対する応答の仕方は異なっている。本研究では、錐体と桿体の応答が異なる分子基盤を、コイ網膜から精製した錐体、桿体視細胞を用いて検討した。その結果、応答に係わる視細胞外節部の脂質組成や蛋白質組成に違いが見出され、さらに、細胞応答に関わる複数の反応の効率が錐体と桿体では異なることが明らかになった。これらの違いが応答の違いをもたらす一因であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In vertebrate retina, there are two kinds of photoreceptor cells, called cones and rods. Cones and rods mediate daylight vision and night vision, respectively. Corresponding to each function, cones and rods show different characteristics in photoresponses. In this study, the molecular bases of the differences on photoresponses were investigated using isolated cones and rods from carp (*Cyprinus carpio*) retina. It was found that the lipid composition in cell membranes of outer segments, the region of photoreceptor cells generating photoresponses, are different between cones and rods. The proteomic analyses on the expressed proteins in outer segment membranes showed the presence of unknown cone- and rod-specific proteins. In addition, it was found that the efficiencies of some enzymatic reactions working to generate photoresponses are different between rods and cones. These differences are thought to contribute the differences in photoresponses between cones and rods.

研究分野：動物生理化学

キーワード：視細胞 錐体 桿体 光応答

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の網膜には、錐体と桿体の二種類の視細胞が存在する(図1)。錐体と桿体の光に対する応答(光応答)の仕方には、光に対する感度と、応答の持続時間の2つの面で違いがあることが知られている。桿体の感度は、錐体よりも100倍から1000倍ほど高い。このため、錐体は明るい所で、桿体は暗い所で働く。また、光刺激停止後、錐体の応答は桿体よりも速やかに回復する。このため、錐体はより高い時間分解能で光刺激の変化を捉えることが出来る。これらの違いが、どのような分子基盤の違いにより生じるのかは、長年にわたって不明であった。

このような状況下、申請者らがコイ網膜より錐体と桿体を効率よく分離精製する技術を確認したことにより、精製細胞を使って応答特性の違いをもたらす仕組みを生化学的に検討することが可能になった(Tachibanaki, 2001)。申請者らは、本研究を開始する前の段階で既に、錐体と桿体で応答の仕方が異なる仕組みについての研究を精製した細胞を用いて行い、その結果、いくつかの原因となりうる現象を発見した(図2)。

その一方、いまだに検討を行っていない酵素反応機構が違いに関与する可能性(図2~③など)や、錐体と桿体のいずれかに独自に発現している未知の蛋白質が応答の違いを生み出している可能性が考えられる。さらに、以前から指摘されているように、錐体と桿体の細胞膜における脂質組成の違いが応答の違いに関与している可能性についても未だに研究がなされていなかった。

2. 研究の目的

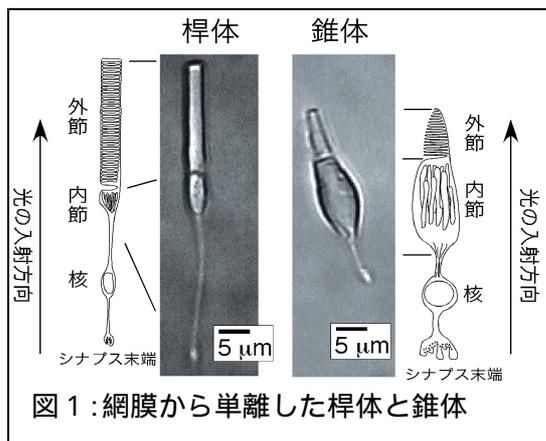


図1: 網膜から単離した桿体と錐体

そこで、本研究においては、錐体・桿体の光に対する感度や応答の持続時間が異なる原因について、コイの細胞を材料として更に検討をすすめることにした。

視細胞において、光を受容し、それを細胞の電気的な応答に変換する働きを担っているのは外節と呼ばれる部分である(図1)。この外節部分は、桿体については網膜試料から精製する技術が既に確立している。我々は、

世界に先駆けて、錐体の外節の分離精製法をこの研究を開始する直前に確立した。このことにより、外節での脂質組成や発現している蛋白質の違いを錐体と桿体とで検討できるようになっていた。細胞の応答形成において、応答形成に関わる酵素反応が生じる細胞膜の脂質組成は、反応効率に大きな影響を与えると考えられる。また、外節部分に存在する蛋白質の量の違いや発現している種類の違いは、応答の違いに寄与すると考えられる。

そこで、本研究では、外節での i) 脂質組成の違い、 ii) 発現しているタンパク質の違いに着目し、この違いがどのように応答の違いに寄与しているのかをまず検討することにした。また、従来の方法で得られている錐体、桿体を材料として、他の側面についても検討を行うことにした。

3. 研究の方法

以上に述べた研究目的のため、以下の4つの研究を行った。

(1) 錐体・桿体の外節の新規精製法の確立

視細胞の応答に関わる外節の脂質組成、蛋白質組成を検討する上で、純度が高く損傷の少ない視細胞の外節試料を得ることは重要である。すでに確立していた方法では、網膜から単離した視細胞(錐体・桿体)を、超音波で破碎し、その後、外節由来の細胞膜をシヨ糖密度勾配で分離精製する、という手順をとっていた。しかし、超音波破碎は比較的過激な方法のため、蛋白質・脂質が変性・酸化する可能性がある。そこで、方法の改良を試みた。

(2) 脂質組成の違いが応答に与える影響の検討

視細胞外節の脂質組成が錐体と桿体で異なる可能性については以前より指摘がなされてきた。しかしながら、錐体外節の単離精製が不可能であったことから、詳細は不明だった。我々は錐体・桿体両方の視細胞の外節膜の精製に成功したので、二次元薄層クロマトグラフィー法、およびガスクロマトグラフィーにより、組成を測定した。また、この組成の違いが応答に及ぼす影響についての測定を試みた。

(3) 蛋白質組成の違いが応答に与える影響の検討

これまでに、錐体・桿体が光を受容してから細胞が電位応答に至るまでのメカニズムについては、共通の機構が働いていることが知られている(図2)。しかしながら、錐体・桿体のいずれかに、光応答形成機構に関わる未知の因子が存在する可能性はいぜん残っている。そこで、そのような因子があるのかどうか検討するため、まず、錐体・桿体のどちらかの外節部にのみ発現しているタンパク質をリストアップすることにした。このた

め、錐体と桿体から外節試料を精製し、含まれる蛋白質を質量分析計（マスペクトル）を用いて網羅的に調べた。

(4)錐体・桿体で共通する反応についての解析

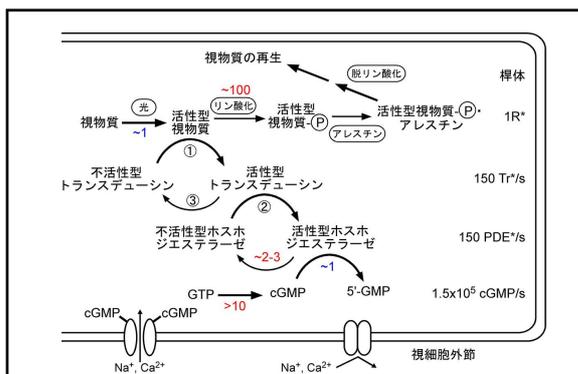


図2 錐体・桿体に共通する光-電位変換機構。視物質が光を受容すると活性化され、トランスデュージン、ホスホジエステラーゼが次々と活性化され、最終的にcGMPが分解されてcGMP依存性陽イオンチャネルが閉じ、過分極が起こる。挿入数字はコイでの我々(赤)の、また、他の動物での他の研究者(青)の報告による錐体での既知の反応効率。桿体での反応を1とした。細矢印は不活性化反応。

錐体と桿体では、図2で示したように応答形成に関わる共通の機構が存在する。この機構の中での幾つかの反応については、錐体と桿体で効率が異なることがすでにこれまでの研究により分かっていたが、本研究では、さらに、トランスデュージンの活性化(図中)、トランスデュージンの不活性化(図中)、トランスデュージンによるPDEの活性化(図中)についても効率が差があるかどうかを検討した。これらの反応は、視物質が光によって活性化された後、膜電位が変化するに至るまでに働く反応であり、細胞応答の様式に深く関わると考えられる。これらの酵素反応に関わる酵素であるトランスデュージンは、錐体では錐体型、桿体では桿体型が発現しており、これにより応答効率が変わるのではないかと考えられた。

これに加えて、アレシチンによる活性化視物質の不活性化、および視物質からの脱リン酸化についても検討を行った。これらの反応は、光を受容して活性化になった視物質が不活性化されて、その後、もとの状態に戻るためにはたらく反応であり、細胞が光に対して応答し続ける上で重要な反応であるが、錐体・桿体で働くアレシチンは異なるタイプであること、また、脱リン酸化についてはその反応が視物質がどのような状態の時に生じるのかについてもよく分かっていないことから、検討を行った。

4. 研究成果

(1)錐体・桿体の外節の新規精製法の確立

これまでに申請者らが開発した方法では、

精製した錐体・桿体から外節部分を分離する際、超音波破碎で細胞を断片化する方法を用いていた。これを改善するため、イオン濃度を変化させたり、酵素を用いたりする方法により外節を細胞から脱落させる方法を検討したが、いずれも上手く行かなかった。そこで、よりマイルドな方法として、細胞懸濁液を注射針のような細い流路に10回ほど通すことにより、機械的に外節を細胞から分離する方法を考案するに至った(Fukagawa et al, 投稿準備中)。この方法で分離すると、超音波破碎法と比べて、試料中のタンパク質や脂質の変性・酸化がより生じにくいと考えられる。このようにして分離した外節とそれ以外の部分を、ショ糖密度勾配を用いて分離することが出来る(図3)。この方法の確立により、以降に述べる課題(2)と(3)の検討がより効率よくおこなえるようになった。

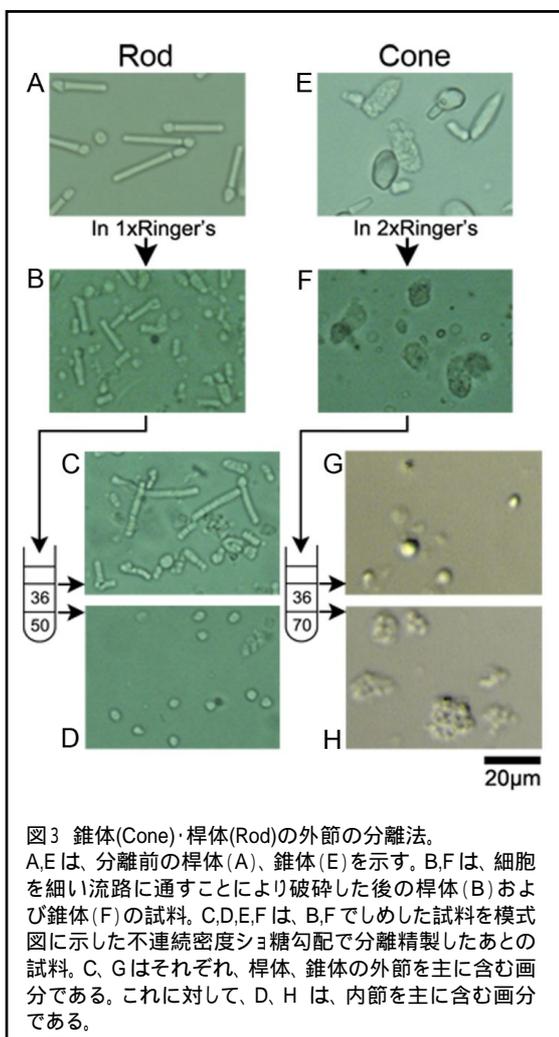


図3 錐体(Cone)・桿体(Rod)の外節の分離法。A,Eは、分離前の桿体(A)、錐体(E)を示す。B,Fは、細胞を細い流路に通すことにより破碎した後の桿体(B)および錐体(F)の試料。C,D,E,Fは、B,Fでしめした試料を模式図に示した不連続密度ショ糖勾配で分離精製したあとの試料。C、Gはそれぞれ、桿体、錐体の外節を主に含む画分である。これに対して、D、Hは、内節を主に含む画分である。

(2)脂質組成の違いが応答に与える影響の検討

錐体と桿体の外節が分離精製出来ることから、外節の細胞膜の脂質の組成を測定した。細胞膜に含まれるリン脂質の種類と量比は、高性能薄層クロマトグラフィー法により解析した。また、リン脂質に含まれる脂肪酸残

基の種類についてはガスクロマトグラフィー法により測定した。さらに、細胞膜に含まれるコレステロールの含有量の違いについても検討した。

その結果、リン脂質の成分比について、桿体外節で有意にフォスファチジルエタノールアミンの含有量が多いことが分かった。また、リン脂質に含まれる不飽和脂肪酸(DHA)の量が桿体で1.3倍ほど高かった。さらに、コレステロールの含有量が、桿体では錐体の10分の1程度であった。

これまでに、桿体膜を使った先行研究が行われてきており、その結果と照らし合わせると、上記の錐体と桿体の脂質組成の差は、いずれも桿体の方で視物質がトランスデューシンを活性化する際の効率を高くする方向に働くと考えられる(Ito et al, 投稿準備中)。項目(4)で後述するように、錐体と桿体とでは、視物質によるトランスデューシンの活性化効率の差が約4倍であることがわかっており、この差が脂質組成の違いによってもたらされているかどうかは今後明らかにすべき点である。現在、研究を継続中である。

(3)蛋白質組成の違いが応答に与える影響の検討

項目(1)で述べたように錐体・桿体の両方から外節膜を精製できるようになったので、それぞれに含まれるタンパク質をプロテオミクスの手法で網羅的に調べ、次に、このなかから錐体あるいは桿体特異的な蛋白質をリストアップした。これまでに、錐体特異的な蛋白質の候補としては約20種類弱、桿体特異的な蛋白質の候補としては約100種類の蛋白質を得ることが出来た。現在、これらの錐体・桿体における局在を確認し、本当にそれぞれの細胞に特異的なものなのかを確認している。現在までのところ、錐体の候補蛋白質7種類についての検討を行い、外節に存在するが桿体外節には存在しない蛋白質として、ニューロカルシンBを見出した(Fukagawa et al, 投稿準備中)。現在、この酵素が錐体においてどのような働きをしているのかを解析中である。

今後、同様の解析を他の候補蛋白質についても継続し、それぞれが錐体、桿体でどのような働きをしているのかを検討することで、よく似ていながら異なる性質を有する錐体と桿体が、どのようにして異なるのか、その機序について、多くの知見を得ることが出来ると期待される。

(4)錐体・桿体で共通する反応についての解析

トランスデューシンの活性化(図2中)及びトランスデューシンの不活性化(図2中)がどの程度の効率で生じるのか、錐体と桿体で測定した。その結果、活性化については、錐体は桿体の4分の1程度の速度で生じることがわかった。このことは、錐体での光

シグナルの増幅の度合いを小さくするので、錐体の光感度が低いことの原因となると考えられる。また、トランスデューシンの不活性化について、錐体では桿体の2.5倍程度速く生じることがわかった。この早い不活性化は、錐体に短い光応答をもたらすと考えられる(論文)。

トランスデューシンの活性化(図中)についても錐体と桿体で効率に差があるかどうかを検討した。この結果、差は殆ど無いことがわかった(論文)。この酵素反応は、錐体と桿体の応答の違いには寄与していないことがわかった。

また、アレスチンによる活性化視物質の不活性化について検討した。これまで、アレスチンは、リン酸化された視物質に結合することにより、視物質が完全に不活性化されると考えられてきた(図2参照)。しかし、今回の検討により、アレスチンはリン酸化されていない活性型視物質にも直接結合して不活性化することが分かった。これは、従来の知見を覆す結果であり、従来考えられてきたアレスチンの働きかたについて、視細胞に限らず、アレスチンが働いている多くの系での仕組みの再考を促す知見である。また、桿体と錐体とでアレスチンが視物質によるトランスデューシンの活性化を抑制する働きを比較したところ、錐体の方がより強力に効果を及ぼしていることがわかった。この効果は、錐体の低い感度、短い応答時間に寄与する他、順応できる光強度の領域を広げる効果もあると考えられる(論文)。

さらに、視物質からの脱リン酸化についての検討を行った。視物質は、光を受容した後、トランスデューシンを活性化する活性型視物質になり、その後、リン酸化され、不活性化される。この後、発色団レチナルが視物質から解離する。このため、もとの視物質にもどって再び光を受容するためには、脱リン酸化され、また、新たな発色団を再結合する必要がある。この脱リン酸化については、発色団の解離に伴って生じ、効率のよい視物質の再生が生じる、という仮説があったが、本研究により、脱リン酸化は発色団の解離や結合と関係なく生じることがわかった。このことは、従来のモデルを覆すものである。また、錐体では桿体より高効率で脱リン酸化が生じることがわかった(論文)。

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7件)

Yamaoka, H., Tachibanaki, S. and Kawamura, S.

“Dephosphorylation during Bleach and Regeneration of Visual Pigment in Carp Rod and Cone Membranes”, Journal of Biochemistry, 査読あり、Vol. 290(40), 2015, 24381-24890.

DOI:10.1074/jbc.M115.674101

Tomizuka, J., Tachibanaki, S. and Kawamura, S.

“ Phosphorylation-independent Suppression of Light-activated Visual Pigment by Arrestin in Carp Rods and Cones ”, Journal of Biochemistry, 査読あり、Vol. 290(15), 2015, 9399-9411.
DOI:10.1074/jbc.M114.634543

Koshitani, Y., Tachibanaki, S. and Kawamura, S. “ Quantitative Aspects of cGMP Phosphodiesterase Activation in Carp Rods and Cones. ”, Journal of Biochemistry, 査読あり、vol. 289(5), 2014, 2651-2657.
DOI:10.1074/jbc.M113.495325

Tachibanaki, S., Yonetsu, SI, Fukaya, S., Koshitani, Y. and Kawamura, S. “ Low activation and Fast Inactivation of Transducin in Carp Cones. ”, Journal of Biological Chemistry, 査読あり、287(49), 2012, 41186-41194.
DOI:10.1074/jbc.M112.403717

〔学会発表〕(計 4 件)

橘木 修志、熊倉 良太、Tang Whei-Ee、福永 洋一郎、河村 悟、「トランスデュシン活性化能を有するロドプシン褪色中間体と Metall 中間体の同一性に関する検討」、第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年 9 月 13 日～15 日、金沢大学角間キャンパス自然科学本館(石川県金沢市)

深川 貴志、橘木 修志、河村 悟、「桿体・錐体視細胞外節に発現しているタンパク質の比較解析の試み」、日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 17 日～19 日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

浅野 禎三、橘木 修志、河村 悟、「表面プラズモン共鳴法によるコイ cGMP ホスホジエステラーゼ活性化反応の解析」、日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 17 日～19 日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

Tachibanaki, S., Kawakami, N., Koshitani, Y. and Kawamura, S. “ Different efficiencies of enzymatic reactions in the phototransduction cascade between carp rods and cones. ”, 16th International Conference on Retinal Proteins, 2014 年 10 月 5 日～10 日、長浜ロイヤルホテル(滋賀県長浜市)

山岡 弘実、橘木 修志、河村 悟、「基質の状態によらないロドプシンの脱リン酸

化反応速度」、第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25 日～27 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

富塚 順子、橘木 修志、松川(嶋内) 淑恵、河村 悟、「視物質リン酸化に非依存的なアレスチンによる視物質活性の抑制」、日本動物学会第 85 回大会、2014 年 9 月 11 日～13 日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

深川 貴志、橘木 修志、河村 悟、「桿体・錐体視細胞の外節膜に発現している蛋白質の比較」、2014 年度日本動物学会近畿支部研究発表会、2014 年 5 月 10 日、兵庫県立大学新在家キャンパス(兵庫県姫路市)

越谷 祐貴、橘木 修志、河村 悟、「コイ桿体と錐体での cGMP ホスホジエステラーゼの活性化効率の定量的理解」、51 回日本生物物理学会年会、2013 年 10 月 28 日～30 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

山岡 弘実、橘木 修志、河村 悟、「桿体・錐体での視物質の脱リン酸化活性の比較」、51 回日本生物物理学会年会、2013 年 10 月 28 日～30 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

富塚 順子、橘木 修志、松川(嶋内) 淑恵、河村 悟、「桿体と錐体におけるアレスチンによる視物質不活性化の違い」、日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 26 日～28 日、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

佐藤 慎哉、橘木 修志、河村 悟、「AL-OL 反応：錐体視細胞で起こる 11-シスレチナル生成反応」、日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 26 日～28 日、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

富塚 順子、橘木 修志、松川 淑恵、河村 悟、「桿体と錐体におけるアレスチンによる視物質不活性化の比較」、日本動物学会近畿支部研究発表会、2013 年 5 月 11 日、大阪市立大学梅田サテライトホール(大阪府大阪市)

佐藤 慎哉、橘木 修志、河村 悟、「AL-OL 反応：コイ錐体視細胞に特異的な 11-シスレチナル生成反応」、第 16 回視覚科学フォーラム研究会、2012 年 8 月 24 日～25 日、埼玉医科大学毛呂山キャンパス(埼玉県入間郡)

富塚 順子、橘木 修志、松川 淑恵、河村 悟、「コイ桿体と錐体に発現しているアレスチンの同定と比較」、第 16 回視覚科学フォーラム研究会、2012 年 8 月 24 日～25 日、埼玉医科大学毛呂山キャンパス(埼玉県入間郡)

〔図書〕(計3件)

橘木 修志、朝倉書店、光と生命の辞典、
光シグナル伝達(脊椎動物)、2016、2

河村 悟、橘木 修志、医歯薬出版株式会社、
医学の歩み、桿体視物質・錐体視物質-
桿体視と錐体視の機能的差異をもたらす
GPCR、2016、8

Kawamura, S. and Tachibanaki, S.,
Springer Japan, Phototransduction in Rods
and Cones. in T. Furukawa, J. B. Hurley and
S. Kawamura, (eds.) Vertebrate
photoreceptors, 2014, 23

〔その他〕

ホームページ等

・生命機能研究科 細胞内情報伝達研究室
<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~kawamura/index2.htm>

・大阪大学研究者総覧 橘木修志
<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=1987>

6. 研究組織

(1)研究代表者

橘木 修志 (Tachibanaki, Shuji)
大阪大学・生命機能研究科・准教授
研究者番号: 70324746

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し