

令和元年6月10日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07438

研究課題名(和文) 錐体と桿体の外節における脂質・タンパク質組成の違いが光応答に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effects of the differences in lipid and protein compositions in the outer segments of cone and rod photoreceptor cells on light responses.

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、錐体・桿体の光受容部(外節)における脂質組成・タンパク質組成の違いに着目し、これらの違いが細胞の光に対する応答にどのような影響を与えるか解明することを目的とした。

本研究では、まず、コイを材料として、脂質、タンパク質の組成の違いの詳細を解明した。次に、桿体と錐体の間で見られたタンパク質組成の違いが光応答に及ぼす影響を解析するため、特定のタンパク質を欠失させたときにどのような応答になるか調べることにし、遺伝子改変動物の作成を行った。また、脂質組成の違いが光応答に及ぼす影響を解析するため、脂質組成を薬剤を使って変化させたときに酵素反応がどのように変化するかを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

錐体と桿体で光に対する応答の仕方が異なる原因はなにか、について、従来、光を吸収してから細胞が電気的に応答するまでに働く各種の酵素反応の効率に着目した解析が行われてきたが、本研究により、それ以外にも応答に関与する要素の候補をあげることが出来た。この成果は、視細胞に限らず、細胞応答の様子がどのように決まるのか、どのようにしたら変えることができるのか、を検討する上で役に立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)： In this study, we aimed to investigate the effects of the differences in lipid and protein compositions in the outer segments of cone and rod photoreceptor cells on light responses.

We succeeded to isolate the outer segment membranes of rods and cones using carp retina. Using the isolated membranes, we elucidated the details of the differences in the compositions of lipids and proteins between rod and cone outer segments. Next, in order to analyze the effects of differences in protein composition, we made mutant zebrafish lacking cone-specific proteins. In addition, in order to analyze the effect of the difference in lipid compositions, we biochemically studied the dependencies of enzymatic reactions on lipid compositions.

研究分野：動物生理化学

キーワード：視細胞 錐体 桿体 脂質組成 タンパク質組成 光応答

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

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。どちらの細胞も、光刺激を神経情報に変換する働きを担っているが、両者の間で、光に対する感度や応答の持続時間は大きく異なる。異なった様式で応答する二種類の細胞を使い分けることにより、我々は様々な光環境でものを見ることが出来る。

その生理的な働きの重要性から、2種類の視細胞で応答の仕方が異なる原因となる分子基盤は何なのかについては、多くの関心が寄せられている。このため、視細胞の応答機構については、精製が容易な桿体で非常に詳しく調べられている。一方、錐体については、桿体の応答形成に関わる各種タンパク質の錐体型ホモログが存在することがわかっており、このことから、応答を引き起こす分子機構(光情報伝達機構)の根幹部分は錐体と桿体で同一であることがすでにわかっている。同一の仕組みがあるにもかかわらず錐体と桿体で応答が異なる理由については、同一の仕組みではあるものの、錐体は錐体型、桿体では桿体型のタンパク質が働いているために、分子機構の働く速さなどが異なるためであろうと考えられてきた。実際、これまでの多くの研究から、この仮説は妥当なものであることがすでに明らかになっている。

ところが、あまりにもこの仮説の妥当性が強調されるあまり、錐体、あるいは桿体の応答形成に独自の未知因子タンパク質が関わっている可能性や、錐体と桿体の間で見られる脂質組成の違いが応答の違いに関わっている可能性については十分な検討がなされていない状況であった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、錐体・桿体の光受容部(視細胞外節)におけるタンパク質・脂質の組成の違いに着目し、これらの違いが錐体・桿体の応答の違いの一因となっているかどうかの検討を行うこととした。

3. 研究の方法

(1)錐体・桿体外節部の精製法の確立

光応答に関わる因子の違いは、視細胞のなかでも、光を受容して電氣的に応答することに特化した部位である「外節」で見られるはずである。この部分を分析することにより、細胞全体をすべて調べるよりも詳細な解析が可能になる。そこでまず、視細胞外節を精製する技術を確立した。

(2)錐体・桿体外節におけるタンパク質組成、脂質組成の詳細な解析

精製した錐体、桿体の外節の細胞膜に含まれるタンパク質、脂質の組成をそれぞれ LC-MS 法で網羅的に検討した。

(3)脂質組成が視細胞の光応答に及ぼす影響の解析

錐体と桿体の外節で見られる脂質組成の違いが光応答に影響を及ぼすかどうか検討するため、光情報伝達機構の酵素反応に脂質組成の変化が影響を及ぼすかを生化学的に検討した。今回の研究では、いくつかの酵素反応の中で最も定量的な測定が可能な反応(視物質による G タンパク質の活性化反応)について測定を行った。

(4)タンパク質組成の違いが視細胞の光応答に及ぼす影響の解析

錐体と桿体のタンパク質組成の違いを検討し、錐体・桿体のどちらかの外節に特異的に分布しているタンパク質の候補を同定した。次に、これらのタンパク質が実際に外節に存在するかどうかを検討した。さらに、外節に存在した場合は、光応答に関わる可能性があるため、これらのタンパク質の遺伝子改変動物をゼブラフィッシュで作成し、実際に光応答に関与しているかどうかを検討することを試みた。

4. 研究成果

(1)錐体・桿体外節部の精製法の確立

我々はすでに、魚類のコイの網膜から、錐体と桿体を生化学的な解析が十分行えるだけ分離・精製する技術を確立している。この方法により精製した錐体・桿体から外節を精製することができれば、外節のタンパク質組成、脂質組成を調べることが可能となる。

桿体の外節については、網膜からショ糖密度勾配遠心法を用いて精製する技術が 1980 年代に確立している。そこで、コイ網膜から分離精製した錐体・桿体を材料として、この方法と類似の方法で外節をさらに精製することを試み、これに成功した(図 1。雑誌論文③)。この成功により、錐体・桿体のタンパク質組成、脂質組成を詳細に調べることが可能となった。ただ、残念ながら、ショ糖密度勾配法では、水溶性タンパク質は失われてしまう。このため、この試料を使ったタンパク質の検討では、対象は膜タンパク質のみとなり、水溶性タンパク質については検討できない。これまでに、視細胞の応答形成に関わっているタンパク質のほとんどは膜タンパク質で

あることから、この試料を使った解析でも有用な結果は期待できるものの、今後、より包括的な解析を行うためには、水溶性部分も保持した外節を精製する方法を確立する必要がある。現在この方法については検討中である。

(2) 錐体・桿体外節におけるタンパク質組成、脂質組成の詳細な解析

錐体・桿体の外節膜に含まれるタンパク質のうち、膜に強固に結合しているものについてまず解析を行った。その結果、錐体外節に存在するが桿体外節には存在しないタンパク質の候補を 20 種あまり同定した (雑誌論文③)。さらに、外節膜に弱く結合しているタンパク質についても解析を行い、膜構造に関わるとと思われる錐体特異的なタンパク質を同定することが出来た。

次に、脂質組成の解析を行い、桿体では錐体と比べて不飽和脂肪酸を含む脂質が多いことや、コレステロールの含有量が少ないことを見出した。これらの結果は、神経組織の脂質組成と桿体外節膜の脂質組成を比較した過去の知見から予想はされていたものの、錐体外節に関する知見がなかったことから、錐体と桿体で違いがあるのかどうかについてはよくわかっていなかった。今回の我々の解析により、その詳細が明らかになった。

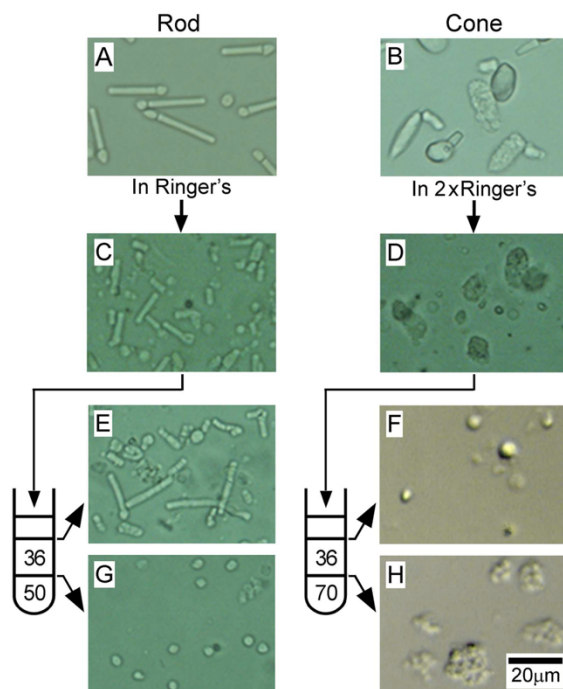


図1：桿体(Rod)、錐体(Cone)からの外節の精製。コイ網膜から精製した桿体 (A)、錐体 (B) を破碎した (C,D) あと、図に示した濃度(%(w/v))のショ糖密度勾配で分画し、外節膜 (E,F) および内節膜 (G,H) を得た。雑誌論文③より改変。

(3) 脂質組成が視細胞の光応答に及ぼす影響の解析

錐体と桿体の外節におけるコレステロールの含有量の違いが光応答に影響を及ぼすかどうか検討するため、コレステロール結合試薬を使うことにより精製桿体外節の細胞膜に含まれるコレステロールの量を様々に変化させた試料を作成した。次に、これらの試料で視物質による G タンパク質活性化反応の効率が異なるかどうかを測定した。この反応は、光受容タンパク質である視物質が細胞内に情報を伝達する最初の反応であり、桿体では錐体と比べてその効率が 5 倍程度高いことが知られている。この違いは、桿体で光に対する感度が高い原因になると考えられている。この違いに、外節に含まれるコレステロール量が影響するかどうかを検討した。実験の結果、桿体のコレステロールを錐体の外節膜と同じ程度に増やしても G タンパク質活性化効率は変化はないことがわかった。この結果は、錐体と桿体の応答の違いにコレステロールの含有量の差は大きな影響を及ぼしていないことを示唆している。その一方で、桿体膜のコレステロールを元の量より減少させると著しく G タンパク質活性化効率が低くなることを見出した。この結果は、コレステロールが視物質による G タンパク質活性化に必須であること示唆している。

本研究ではさらに、不飽和脂肪酸の含有量を変化させた膜試料を作成し (再構成系)、視物質による G タンパク質活性化反応の効率を測定した。その結果、視物質による G タンパク質活性化に不飽和脂肪酸の濃度差の影響が無いことが示唆された。

以上の結果より、錐体・桿体の間での脂質組成の違いは、視物質による G タンパク質活性化反応の効率の違いの原因ではないことが示唆される結果が得られた。今後は、光応答に関わる他の反応についても錐体と桿体の脂質組成の違いが影響を及ぼしているのかどうかについて検討していく必要がある。

なお、今後の研究の発展のため、G タンパク質が効果器タンパク質を活性化する機構について検討を行ったところ、従来考えられているモデルとは異なる分子メカニズムが存在することを示唆する結果を得た (雑誌論文①)。視細胞が光応答するときには、活性化された G タンパク質が効果器タンパク質である cGMP ホスホジエステラーゼ (PDE と略記する) を活性化する反応が必須である。このとき、G タンパク質は PDE の阻害サブユニット (PDEi とする) を触媒サブユニット (PDEcat とする) から外すことにより PDE を活性化する。従来、この活性化のときには、G タンパク質は PDEcat に結合したままの PDEi に直に結合して PDEcat から引き剥がす、と考えられていた。ところが、我々が検討したところ、すくなくとも可溶化した条件下においてはこのような直接的な活性化は生じず、G タンパク質は PDEcat から自発的に解離した PDEi に結合して PDEcat への再結合を阻害することにより間接的に PDE を活性化していることが明らかになった。ただし、in vivo では G タンパク質による PDE の活性化は細胞膜上で生じる。このときは、可溶化条件よりも高い効率で PDE は活性化される。膜特異的な何らかの効果が生じているものと考えられ、この効果についても今後解明する必要があると考える。

(4) タンパク質組成の違いが視細胞の光応答に及ぼす影響の解析

精製した外節に含まれるタンパク質を分析し、錐体外節・桿体外節それぞれに特異的に含まれるタンパク質をリストアップした。その結果、錐体外節特異的に存在するタンパク質の候補として、**neurocalxin delta B** (以下、**NCALB**) が同定された。そこで、実際の細胞内でその局在を確認したところ、意外なことに錐体の外節のみならず、錐体の細胞全体に存在した。しかしながら、膜画分に局在するのは外節のみであり、外節膜においてなんらかの機能を果たすことが示唆された (図2, 雑誌論文③)。すなわち、錐体の応答に関わる可能性が高いと考えられた。このことから、**NCALB** のノックアウトをした遺伝子改変動物をゼブラフィッシュで作成し、その機能を検討することにした。現在、ノックアウト個体の作成は終わっており、行動実験、および電気生理学的な細胞の応答測定により解析を行っているが、いままでのところ明確な結論は得られていない。

ほかにも、桿体、錐体外節に特異的に局在していると思われる数種類のタンパク質について同様の解析を行っており、今後、視細胞の光応答形成機能や外節の形態形成に働いているタンパク質を同定することを目指している。

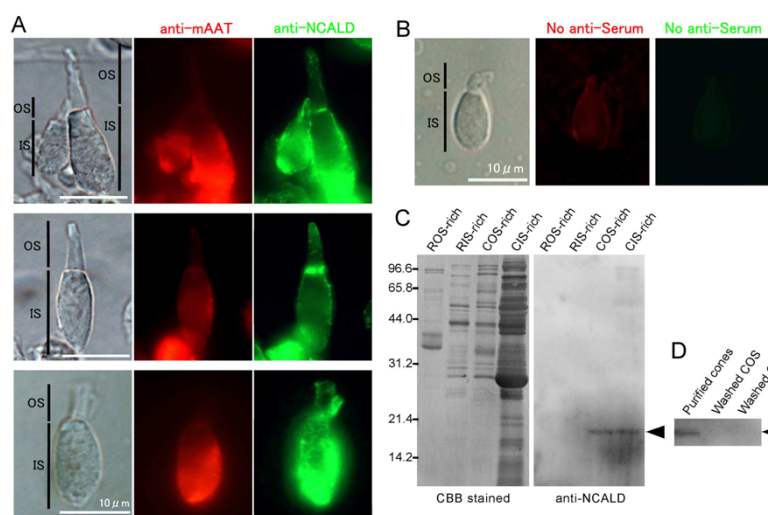


図2：錐体における NCALD の分布。

A: 錐体細胞内の NCALD の分布を、免疫組織化学的手法で観察した。左のパネルは細胞の微分干渉顕微鏡像。中のパネルは、内節に存在するミトコンドリア特異的なタンパク質(mAAT)の局在。右のパネルは、NCALD の局在を示す。B: ラベルした二次抗体だけでは染色されないことを示す。C: 精製した桿体 (rod), 錐体 (cone) の外節 (OS), 内節 (IS) の膜画分を Western blot すると、錐体の外節、内節両方に NCALD の局在が見られた。D: 錐体の膜画分から表在性のタンパク質を洗い流す処理をすると、ほとんどの NCALD はなくなってしまうが、極僅かに外節に残留する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Teizo Asano, Satoru Kawamura, and Shuji Tachibanaki, Transducin activates cGMP phosphodiesterase by trapping inhibitory γ subunit freed reversibly from the catalytic subunit in solution. *Scientific Reports*, 査読有, vol.9, (2019) 9:7245 DOI:10.1038/s41598-019-43675-9
- ② 橋本 修志, 河村 悟, 暗所視と明所視の分子メカニズム – 桿体と錐体の光応答特性を決める仕組みの探索- 比較生理生化学, 査読有, 34 巻(2018), p70-79 DOI: 10.3330/hikakuseiriseika.34.70
- ③ Takashi Fukagawa, Kazuaki Takafuji, Shuji Tachibanaki and Satoru Kawamura, Purification of cone outer segment for proteomic analysis on its membrane proteins in carp retina. *PLoS ONE*, 査読有, vol.12(3), (2017) e0173908 DOI:10.1371/journal.pone.0173908

[学会発表] (計8件)

- ① 門松 恭子 The effect of lipid environment of outer segment membranes on the activation of photoreceptor specific G protein, Transducin. 日本生物物理学会第 56 回年会 (2018)
- ② 橋本 修志 桿体視細胞ホスホジエステラーゼ活性化機構は解離安定化モデルで説明できるか? 日本動物学会第 89 回大会 (2018)
- ③ 門松 恭子 脂質膜環境が G タンパク質 Tr の活性化効率に及ぼす影響、日本動物学会近畿支部春季研究発表会 (2018)

- ④門松 恭子 桿体・錐体外節膜における脂質組成の解析、日本生物物理学会第 55 回年会 (2017)
- ⑤橋本 修志 桿体視細胞におけるホスホジエステラーゼ活性化機構、日本動物学会第 88 回大会 (2017)
- ⑥橋本 修志 視細胞におけるホスホジエステラーゼ活性化機構、視覚科学フォーラム第 21 回研究会 (2017)
- ⑦橋本 修志 錐体・桿体視細胞それぞれに特異的に発現しているタンパク質の探索、日本動物学会近畿支部発表会 (2017)
- ⑧橋本 修志 Transducin activates cGMP phosphodiesterase indirectly、日本生物物理学会第 54 回年会 (2016)

[その他]

ホームページ等

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=1987>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：妹尾 圭司

ローマ字氏名：(SENO, Keiji)

所属研究機関名：浜松医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：50283908

(2) 研究協力者

なし

※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。