

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770150

研究課題名（和文）錐体視細胞が明るいところで働き続けられる仕組みの解析

研究課題名（英文）Analysis on mechanisms that enable cone photoreceptor cells to work under continuous light conditions.

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

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物の網膜には、視細胞として、錐体と桿体が存在する。錐体は明るいところでの、桿体は暗いところでの視覚を司っている。錐体は、明るい光環境下でも、光刺激に対して的確に応答をすることができる。我々は、本研究で、(1) 錐体において、光受容タンパク質がリン酸化により不活性化される反応が強く調節されていることを明らかにした。また、(2) 錐体では、リン酸化された光受容タンパク質が迅速に脱リン酸化される仕組みがあることを見出した。これらの機構は、錐体が明るいところで働き続けられる仕組みとして働いていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In vertebrate retina, there are two types of visual photoreceptor cells, called rods and cones. Rods mediate night vision, and cones mediate daytime vision. It is well known that cones are able to generate an exact photoresponse to a light stimulus even under bright conditions where cones receive light stimuli continuously. In this study, we found that, in cones, (1) the efficiency of the inactivation of visual pigments by phosphorylation is strongly modulated, and (2) phosphorylated visual pigments are dephosphorylated rapidly. These mechanisms seem to enable cones to generate responses under bright conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：光生物、生体分子、タンパク質、視細胞、錐体、レチナール、視物質のリン酸化、視物質の脱リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

われわれ脊椎動物の網膜には、光を受容して神経情報に変換する視細胞が存在する。視

細胞には、桿体と錐体の2種類がある。桿体は暗いところで、錐体は明るいところでものを見るときに働く（「3. 研究の方法」図1

参照)。

視細胞において、光を受容する働きを担うタンパク質は視物質である。視物質は、光を受容するための発色団として、ビタミンAの誘導体である11-cisレチナールを結合している(「4. 研究の成果」図2、A)。光を吸収すると、この発色団の構造が、11-cis型からall-trans型へと異性化する(図2、B)。この構造変化をきっかけとして視物質は活性型となり、細胞応答を引き起こす。その後、しばらくすると視物質はリン酸化されることにより不活性化され(図2、C)、さらに、異性化したレチナールはタンパク質から解離する(図2、D)。リン酸化され、レチナールが解離した視物質(使用済み視物質、図2、E)は、そのままでは再び光を受容することが出来ない。このため、視細胞では、使用済みの視物質を脱リン酸化し(図2、F)、さらに11-cisレチナールをあらたに結合させ、視物質をリサイクルする(図2、G)。明るいところで働く錐体では、視物質の消費が激しいので、桿体よりも素早くリサイクルをする必要がある。

研究開始当初、我々は、このリサイクルに関わる新規の錐体特異的な反応を見いだしていた(図2、赤矢印、Miyazono et al, PNAS, 2008)。この反応は、リサイクルに必要な発色団である11-cisレチナールを、11-cisレチノールから合成する酸化反応(図2、H)である。非常に興味深いことに、この発色団の合成反応(図2、H)は、使用済み発色団(all-trans型レチナール)の処理反応(還元反応、図2、I)と共役していることがわかった。この酸化還元共役反応を我々はAL-OL反応と名付けた(retinAL-retinOL酸化還元共役反応の意)。AL-OL反応の効率は非常に高く、11-cisレチナールの効率よい供給を可能にしている。したがって、この反応は、視物質を高効率でリサイクルする上で重要な反応であると考えられ、また、この反応が酵素によって触媒されていることが既に解っているが、その酵素実体は不明であった。

また、我々は、錐体において、視物質の脱リン酸化反応(図2、F)が桿体よりも高効率であることを示唆する結果をすでに得ていた。使用済み視物質の脱リン酸化は、視物質を元の状態にリサイクルする上で必須のプロセスである。この過程が高効率であることは、視物質を効率よくリサイクルする上で重要である。しかし、その当時、生理的条件下での速度を検討できる条件での測定は行なっておらず、また、速度の違いを生み出す分子メカニズムの違いについては、一切が不明であった。

## 2. 研究の目的

視細胞には、持続した光受容を可能にする

ため、光受容タンパク質(視物質)をリサイクルする代謝系が存在する。桿体と錐体を比較すると、錐体は明るいところで働くので、視物質の消費がより激しい。したがって、錐体には、より高効率の視物質代謝システムが存在すると考えられている。しかし、その全容は十分に解っていない。そこで、その仕組みを明らかにすることを目的とした。特に、

- (1) 錐体特異的AL-OL反応、
- (2) 錐体において高効率で生じる視物質の脱リン酸化反応

の二つに着目し、この2つの現象の分子メカニズムの解明を行うこととした。

## 3. 研究の方法

我々の研究室では、コイ網膜から、錐体と桿体を生化学的な実験が出来るレベルで大量に分離精製する方法をすでに確立していた

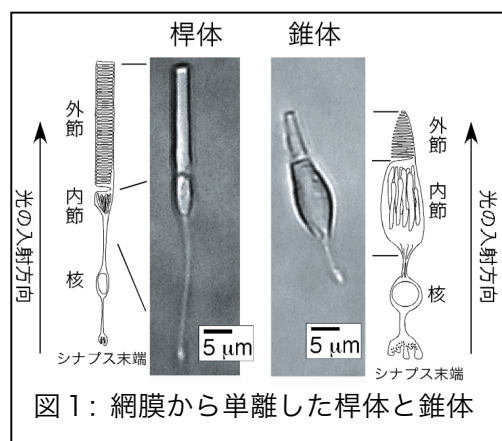


図1: 網膜から単離した桿体と錐体

(図1参照)。そこで、この方法により得られる錐体、桿体を材料として、前項の2つのテーマについて、以下の様な方法でのアプローチを試みた。

### (1) 錐体特異的なAL-OL反応の解析

コイの網膜から精製した錐体より、カラムクロマトグラフィにより当該酵素を精製する方法を確立することを試みた。用いたカラムは、陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラム、アフィニティカラム(糖鎖結合性のConAカラム、ヒドロキシルアパタイトカラム)である。さらに、ネイティブPAGE法によりタンパク質を分離精製できるかどうかを試みた。次に、様々な方法で錐体に含まれるタンパク質を分画した後、それぞれの画分のAL-OL反応活性を測定し、目的とする酵素が含まれるかどうかを判定した。さらにその後、活性の高い画分に含まれているタンパク質について、マスペクトル等により同定することを試みた。

### (2) 錐体において高効率で生じる視物質の脱リン酸化反応の解析

まず初めに、コイ網膜から得られた錐体、桿体から、膜試料を調製した。これは、視細胞において光受容体である視物質は膜タンパク質であり、そのリン酸化、脱リン酸化を行う酵素群が主に膜画分に含まれることが示唆されているためである。

次に、この膜試料を用いて、生理条件に近い条件下での視物質の脱リン酸化反応の効率が、錐体と桿体とでどれくらい異なるかを生化学的手法で詳細に検討した。次に、錐体・桿体で視物質の脱リン酸化をしている酵素の同定を薬理的な方法により試みた。これまでの報告で、錐体・桿体で働いている視物質脱リン酸化酵素はPP2Aである、といわれている。そこで、PP2Aのブロッカーであるオカダ酸や、他の脱リン酸化酵素ブロッカーが、視物質の脱リン酸化を阻害するかどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

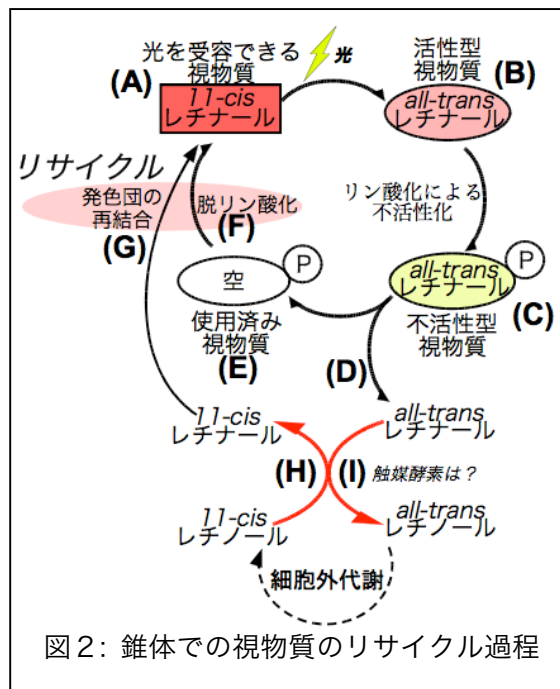
前項の2つのテーマについて、以下の様な成果を得た。

##### (1) 錐体特異的なAL-OL反応の解析

錐体では、図2中の反応H、Iが同時に進行する(AL-OL反応)。この反応の触媒を行なっている酵素を同定することを目指し、錐体細胞からカラムクロマトグラフィ等により当該酵素を精製する方法の確立に取り組んだ。特定のカラムを使うと酵素活性が激減したり、あるいはカラムからの溶出に必要な塩濃度が高すぎることで酵素活性が阻害されたりする現象があったため、精製条件の検討は困難を極めた。しかし、継続して解析を積み重ねることにより、現段階では、ネイティブPAGE法と陰イオン交換カラムクロマトグラフィ法を組み合わせた方法で、10種類弱のタンパク質が含まれるAL-OL反応活性の高い画分を得ることに成功している。見出された精製法は比較的簡便であり、なおかつ酵素活性の損失が比較的抑制されている。今後の検討を行う上で非常に有力な方法を構築することができたと考えている。また、このようにして得られた画分に含まれるタンパク質のいくつかについては、マススペクトル法により同定することに成功している。しかしながら、残念ではあるが、計画年度中に、それらのうちでAL-OL反応活性を持つものがあるのかどうかを決定するまでには至らなかった。現在、解析を続行している。

このテーマについて得られた成果について、まだ現状で探索している酵素の同定に至っていないため、大変残念ではあるが、いまだ対外的な位置づけ、インパクトを評価する段階にない。しかしながら、同様の研究を行っているグループは現在皆無であると考えられ、また、候補タンパク質についての情報がすでに十分に蓄積している現在の我々

研究グループのアドバンテージは大きいと考えられることから、今後、当該酵素の同定に至り、その後の解析も引き続き行った場合のインパクトは相応に大きいのではないかと期待している。



##### (2) 錐体において高効率で生じる視物質の脱リン酸化反応の解析

視物質の脱リン酸化(図2、反応F)は、視物質のリサイクルで非常に重要である。

そこで、まず初めに、生理条件に近い条件下での脱リン酸化反応の効率が、錐体と桿体とでどれくらい異なるかを検討した。その結果、膜試料の場合、桿体より錐体の方が視物質の脱リン酸化活性は約7倍高いことが示された。この高い酵素活性は、錐体における速やかな視物質のリサイクルを可能にしている、と考えられる。

次に、錐体における視物質の高効率な脱リン酸化反応をもたらす分子基盤を検討するために、脱リン酸化酵素の薬理的な同定を試みた。その結果、視物質の脱リン酸化に働いていると従来考えられていたPP2Aがほとんど実際には働いていないことが明らかになり、他の種類の脱リン酸化酵素の存在を検討する必要があることがわかった。現在までの解析では、錐体・桿体ともにPP2Cが視物質の脱リン酸化酵素として働いていることを強く示唆する結果を得ている。残念ながら、現段階では、有効な抗体の作成が遅れるなどの事情で同定に至っていない。

なお、この研究テーマと関連して、錐体と桿体とで、視物質が一分子あたり何個のリン酸化修飾を受けると不活性化されるのか解析を行った。その結果、視物質の活性を抑え

るためには、桿体では視物質あたり2～3個程度のリン酸基の結合が必要であるのに対し、錐体では1個程度のリン酸化が生じれば十分であることが明らかになった。この結果は、錐体・桿体での脱リン酸化反応の効率の違いの生理的意義を正しく評価する上で重要な知見である。

以上、このテーマについて得られた効果について、国内の学会で発表したところ、当該分野の研究者には好評であった。当該分野の研究者からは、視細胞の機能を考える上で、視物質の脱リン酸化反応は重要な反応であるが、これまで解析が不十分であり、詳細がわかっていないので、今後の進展を期待する、等の評価を得た。当該分野における重要な寄与が出来る、と思われることから、今後も継続して研究を行なって行きたい。

以上の成果に加え、我々は、視物質の脱リン酸化と拮抗する反応である視物質のリン酸化反応について、新しい知見を得た。視物質のリン酸化反応の効率は、光刺激の大きさで変化する細胞内Ca濃度によって調節されることも知られているが、その調節される程

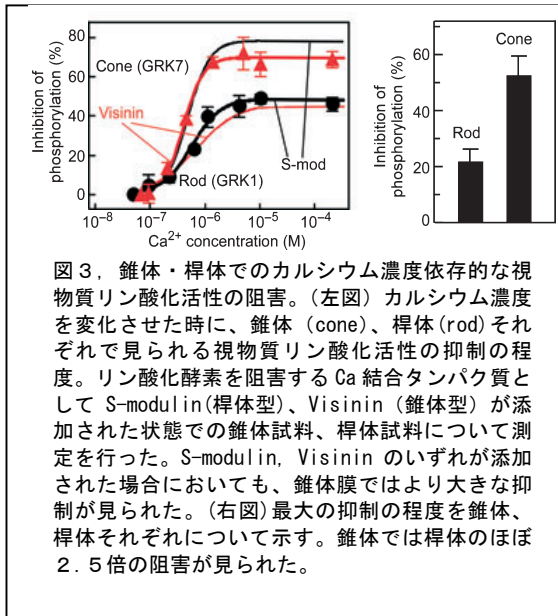


図3. 錐体・桿体でのカルシウム濃度依存的な視物質リン酸化活性の阻害。(左図)カルシウム濃度を変化させた時に、錐体(cone)、桿体(rod)それぞれで見られる視物質リン酸化活性の抑制の程度。リン酸化酵素を阻害するCa結合タンパク質としてS-modulin(桿体型)、Visinin(錐体型)が添加された状態での錐体試料、桿体試料について測定を行った。S-modulin, Visininのいずれが添加された場合においても、錐体膜ではより大きな抑制が見られた。(右図)最大の抑制の程度を錐体、桿体それぞれについて示す。錐体では桿体のほぼ2.5倍の阻害が見られた。

度が、錐体においては桿体よりも大きいことを明らかにした(Arinobu et al, J. Neurochem., 2010)。

この成果は、すでに国際誌に発表し、錐体と桿体の機能の違いをもたらす機構に関する重要な知見との評価を得ている。視物質の脱リン酸化反応を効率良く進めるためには、それと同時に拮抗反応であるリン酸化反応をなるべく抑えておく方が望ましい。今回の結果は、錐体では、その拮抗反応の抑制も効率良く行われていることを示唆しており、今後、錐体における脱リン酸化反応を解析する上で重要な知見であると考えている。

## 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1件)

① Daisuke Arinobu, Shuji Tachibanaki, and Satoru Kawamura, Larger inhibition of visual pigment kinase in cones than in rods, Journal of Neurochemistry, 査読有、第115(1) 巻 (2010)

[学会発表] (計4件)

① 橋木 修志・越谷 祐貴・河村 悟、錐体視細胞における低いトランスデューション活性化効率、日本生物物理学会第49回年会、2011.9.16、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス

② 山岡 弘美・橋木 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と解析、日本動物学会近畿支部研究発表会、2011.5.14、京都大学大学院理学研究科セミナーハウス

③ 瀬野 亜希・竹本 訓彦・Lalida Sirianant、橋木 修志・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解析、日本動物学会第83回年会、2010.9.23、東京大学駒場キャンパス

④ 橋木 修志・河村 悟、錐体・桿体視細胞の応答様式を決める分子メカニズム、日本生物物理学会第48回年会、2010.9.21、東北大学仙台北キャンパス

[その他]

ホームページ等

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/kg-portal/aspi/RX0011D.asp?UNO=10680&page=>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋木 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

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし