

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06763

研究課題名(和文)脊椎動物視細胞の外節における脂質環境と構造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 lipid environment and structure in the outer segments of vertebrate photoreceptors on light response.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物は、明るい所で働く錐体と暗い所で働く桿体の2種類の視細胞をもつ。錐体と桿体の光に対する感度は大きく異なる。本研究では、錐体・桿体の光受容部(外節)の脂質組成や構造・発現タンパク質の違いが細胞応答の形成、特に感度の違いにどのような影響を及ぼすかを解明することを目的とした。その結果、桿体と錐体の脂質組成が異なることに対応して、外節におけるラフト様領域の分布が異なることを示唆する結果をえた。また、錐体外節に特異的に発現していることが見いだされたタンパク質について、変異体ゼブラフィッシュを用いた実験から、細胞応答に影響をおよぼしていることを示唆する結果を得た。

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、従来考えられていた光情報伝達機構で働くタンパク質のサブタイプの違い以外にも原因が存在することを示唆する結果を得られた。我々の視覚は、受容体である視細胞の応答特性によって見え方が規定されるが、その成り立ちについて新しい視点が得られた。今後の詳細な検討により、視細胞機能にかぎらず様々な細胞の応答の理解が深まり、また、その変化を検討するときに有力な手がかりを得られるのでは無いかと期待する。

研究成果の概要(英文)：Vertebrates have two types of photoreceptors: cones and rods. Cones and rods are responsible for daytime and nighttime vision, respectively. The sensitivity of cones and rods to light differs greatly. The purpose of this study was to determine how differences in lipid composition, structure, and expressed proteins in the outer segments of each cell affect the formation of cellular responses, particularly differences in sensitivity. The results suggest that the distribution of raft-like regions in the outer segment differs according to the differences in lipid composition of the rod and cone. Experiments with mutant zebrafish also suggested that proteins found to be specifically expressed in the cone outer segments affect cellular responses.

研究分野：動物生理学

キーワード：視細胞 錐体 桿体 光応答 脂質環境 光情報伝達

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の網膜には、ものを見るために、光を神経情報に変換する働きを担う細胞である視細胞が存在する (図 1)。視細胞には錐体と桿体の 2 種類があることが知られている。錐体と桿体では光に対する感度が異なる。桿体の感度は錐体よりも 100 倍から 1000 倍ほど高い。我々の視覚が、きわめて広い光強度のレンジで破綻なく機能するのは、感度の異なる 2 種類の視細胞を使い分けることができるからである。このため、この感度のちがいを生み出す仕組みは、我々の視覚を支える分子メカニズムとして長年にわたり研究の対象となってきた。

錐体と桿体が光に対して応答する際に働く細胞内情報伝達機構は、応答形成機構、応答終息機構とも共通の仕組みがあることが知られておる。その一方で、仕組みは同じであっても、錐体・桿体それぞれで働いているタンパク質は、それぞれの細胞独自のタイプのものである (サブタイプが異なる)。したがって、仕組みは同じだが、酵素反応の効率異なるであろうことが予想された。実際、我々が魚類のコイから分離精製した錐体・桿体を用いてそれぞれの反応効率を測定したところ、いくつかの応答に関わる反応で効率が異なることがわかった。この違いにより、光シグナルを増幅する程度が錐体では桿体より低くなり、結果として低い感度をもたらすと考えられている。

しかし、錐体と桿体で酵素反応の効率が異なる原因については十分に理解が進んでいない。上記のように錐体と桿体の酵素のサブタイプの違いがあることが第一の原因と思われたため、複数の研究グループが受容体・G タンパク質・受容体キナーゼについて錐体・桿体型のサブタイプを入れ替える実験を行ったものの、効果は限定的なものであった。このような背景から、私は、錐体・桿体で発現している酵素のサブタイプの違いの他に、応答の違いをもたらす何らかのファクターがあるのでは無いかと考えるようになった。

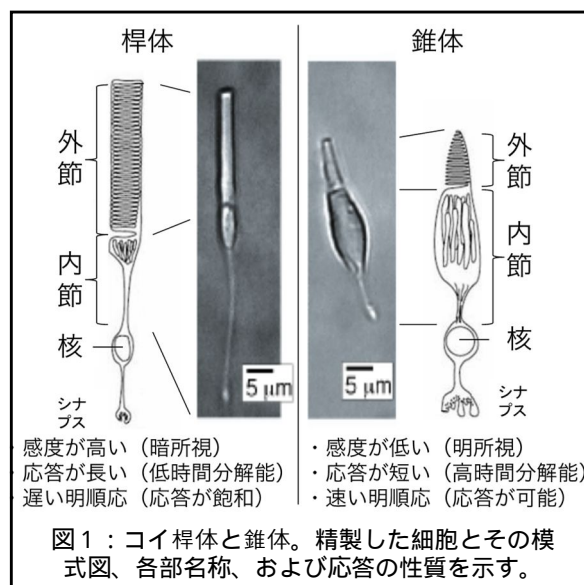


図 1: コイ桿体と錐体。精製した細胞とその模式図、各部名称、および応答の性質を示す。

2. 研究の目的

前述のような背景のもと、本研究では、視細胞において、応答形成機構が存在する光受容部 (外節、図 1 参照) の脂質組成や構造・発現タンパク質の違いが細胞応答の性質、特に感度の違いにどのような影響を及ぼすかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

以下に、[1]~[3]の各解析についてその手法を述べる。

[1] 脂質組成が視物質による Gt の活性化反応の効率に及ぼす影響の解析

これまでの申請者らの研究から、桿体では錐体よりもコレステロールの含有量が 5-10 倍ほど低く、さらに不飽和脂肪酸の含有量は 1.5 倍ほど高いことがわかっている。このような脂質組成の違いが、応答形成過程、中でも特に視物質による三量体 G タンパク質 (Gt) の活性化効率に影響するかどうかを、生化学的な方法により検討することにした。コレステロールの影響は、錐体・桿体の外節膜に含まれるコレステロールの量をコレステロール結合試薬 (MBCD) で増減させたとき、酵素反応の効率がどのように変化するかにより検討した。不飽和脂肪酸の影響については、不飽和/飽和脂肪酸を持つさまざまな合成リン脂質を外節の膜に加えた際に酵素反応の効率がどのように変化するかを検討した。

[2] 錐体・桿体における視物質周辺の脂質環境の解析

脂質組成は外節の膜で様ではなく、視物質が活性化されると、特異な脂質環境がそのまわりに構築されることが指摘されている。それがどのような脂質環境であるかを、研究分担者である妹尾が開発した IRIMS 法 (Immunologically Restricted Ionization Mass Spectrometry) を用いて解析することを試みた。これに加え、錐体・桿体の外節のラメラ膜中でラフト様領域がどのように分布しているのかを、ラフト親和性の蛍光ラベル脂質を視細胞に添加することにより可視化して観察した。

[3] 新規錐体特異的タンパク質が応答に及ぼす影響の解析

錐体外節に特異的に見いだされたプロミンと Neurocalcin B¹⁾ について、応答に及ぼす影

響を解析することにした。解析のために、ゼブラフィッシュの当該タンパク遺伝子に CRISPR/Cas により変異を導入し、ノックアウト個体を作成することを試みた。ノックアウト個体で視細胞応答がどのように変化するのは、稚魚の視機能性眼球反応 (Optokinetic Response; OKR) および成魚の網膜電位図法 (ERG) で検討することにした。

4. 研究成果

[1] 脂質組成が視物質による Gt の活性化反応の効率に及ぼす影響の解析

精製したコイ桿体視細胞の外節膜をコレステロール結合試薬 (MBCD) で処理することにより、元のコレステロールの濃度を 0.2~7 倍の範囲で変化させた。次に、調製した膜に、精製した桿体視細胞特異的な三量体 G タンパク質 (Gt) を加え、膜に含まれる活性型光受容タンパク質 (ロドプシン) がどれくらいの効率で Gt を活性化するかを測定した。

その結果、桿体の膜コレステロール含有量を錐体なみに上昇させても Gt の活性化効率は全く変化しないことがわかった。一方、コレステロール濃度を元の濃度の 0.2 倍程度に下げると Gt の活性化が全く生じることが分かった。

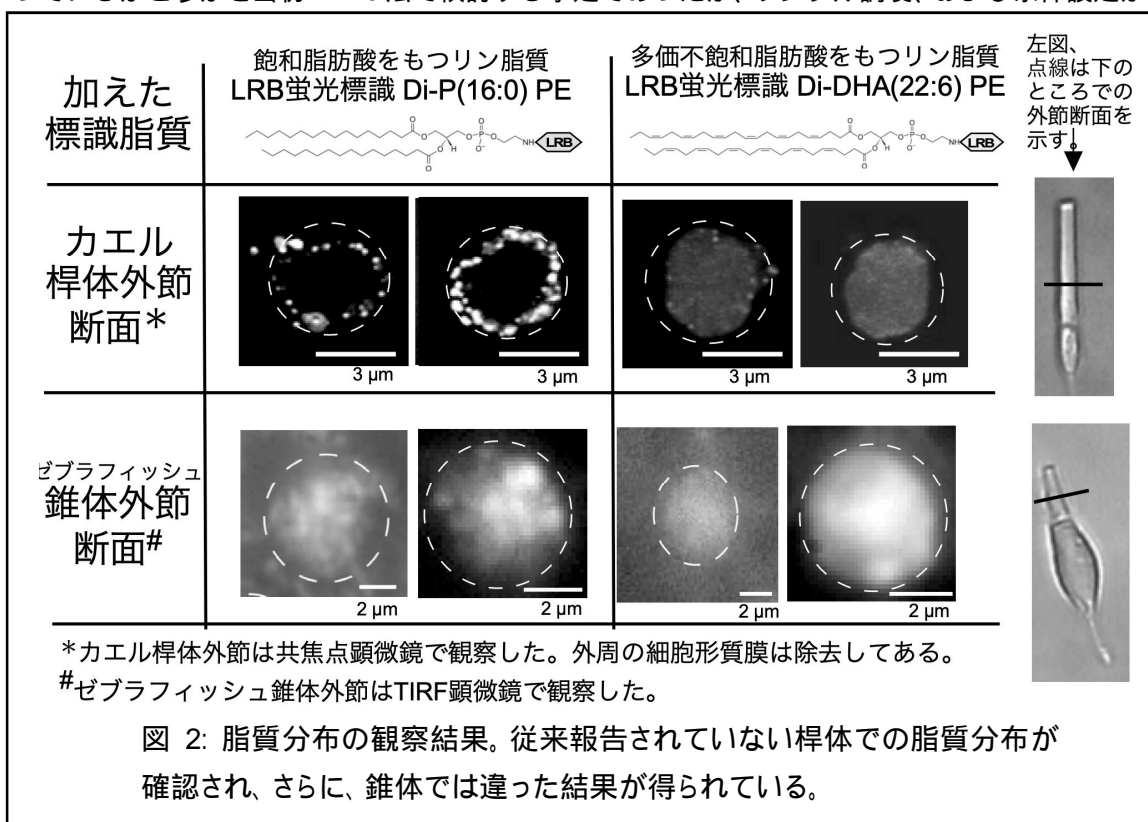
従来、視細胞外節膜内のコレステロール濃度は、光受容タンパク質 (ロドプシン) の活性化状態に対して影響を与える可能性が分光学的解析から指摘されていたが、実際の活性化には余り影響をあたえていないこと、しかし、一定以上の濃度は Gt 活性化に必須であることが分かった。

さらに、精製したコイ桿体視細胞外節膜を界面活性剤で可溶化した後、コイ錐体と同様の不飽和脂肪酸濃度にまで不飽和脂肪酸を持つリン脂質を添加し、その後、透析で界面活性剤を除去することにより、錐体膜組成に近いリポソーム (光受容体タンパク質は含まれている) を再構成した。この膜に精製した Gt を添加して、膜に含まれる活性型光受容タンパク質 (ロドプシン) がどれくらいの効率で Gt を活性化するかを測定した。その結果、不飽和脂肪酸組成のみを錐体に似せても、脂質のヘッドグループの組成と不飽和脂肪酸組成両方を錐体に似せても、Gt の活性化効率にほぼ影響を及ぼさないことが明らかになった。

以上のことから、錐体と桿体とでは外節における脂質組成は異なっているものの、桿体外節の脂質組成そのものを錐体の様に変えただけでは Gt 活性化に及ぼす影響はみられないことが明らかになった。すなわち、当初の仮説は証明できなかった。もし、脂質組成が応答に影響を及ぼすとしたら、Gt 活性化以外のどこかの過程か、あるいは別の要因 (それぞれの細胞に特有な脂質分布) によるのかもしれない (項目 [2] を参照)。

[2] 錐体・桿体における視物質周辺の脂質環境の解析

2019 年、神戸大学の林らはカエル桿体の外節のラメラ膜において、脂質や光応答に関わるタンパク質が一様には分布しておらず、分子ごとに特徴的な分布をしていることや、その分布が光刺激で変わることを示した²⁾。このような外節における応答関連因子の特徴的な細胞内局在は、細胞応答になんらかの影響を及ぼしていると考えられる。このような局在が錐体と桿体で異なっているかどうかを当初 IRIMS 法で検討する予定であったが、サンプル調製、および条件設定が



定まらなかったため、蛍光ラベル分子での観察を行うことにした。

応答形成に関わるタンパク質はいずれも膜表在性、あるいは膜貫通型のタンパク質である。したがって、どのように細胞内で分布するのかは、細胞膜を構成する脂質の組成分布によって影響を受けることが知られている。特に、飽和脂肪酸を持つリン脂質（ラフト親和性脂質とよぶ）やコレステロールが集まって作る流動性の低い領域（ラフト様領域）は、シグナル伝達に関わる分子が集まる場所として注目されている。

そこで、ラフト親和性脂質に蛍光ラベルを付加したものを調製し、これを精製したカエルおよびゼブラフィッシュの錐体に添加することにより、錐体・桿体でラフト様領域がどこに分布するのかを計測した。その結果、桿体では、外節外周部に特徴的にスポット状のラフト様領域が認められたが、錐体ではそのような分布は見られなかった(図2)。このような桿体に特徴的な分布は、応答形成になんらかの影響を及ぼし、錐体との違いの原因となり得ると考えられるため、現在、それを検証する実験を行うことを計画している。

[3] 新規錐体特異的タンパク質が応答に及ぼす影響の解析

錐体外節に分布することが新規に同定されたプロミン、および Neurocalcin B について、それぞれの遺伝子を CRISPR/Cas9 により編集し、当該タンパク質のノックアウト個体を作成することを試みた。

プロミンについては、研究開始時の目標としたタンパク質であり、はじめに着手したが、ノックアウト変異を導入することに手間取り、現在に至るまで実験に供する個体を十分量得ることが出来ていない。今後、検討を行っていきたい。

一方、Neurocalcin B については、2塩基欠失のノックアウト変異を導入・選別することに成

功した。得られたノックアウト個体について、視覚機能に影響を及ぼしているかどうかを検討するため、視機能性眼球反応 (Optokinetic Response; OKR) に変化が生じるかどうかを検討した。その結果、生後6日の稚魚について、比較的薄暗いところでのOKRが野生型と比べると安定しないことを見いだした。従来、このタンパク質については、視細胞には発現しておらず、網膜では二次ニューロン以降に発現しているといわれていたが、その分布を検討したところ、むしろ視細胞につよく発現していることが分かった(図3)ことから、変異体でのOKRの変化は錐体での neurocalcin δ Bの欠失によると考えられる。実際に視細胞の応答にどのような影響を及ぼしているのかは、ERG法による詳細な検討が必要であるが、現在、変異に伴う変化が安定的に観測される光条件の検討を行っている。今後、条件設定が終了したら、詳細にその変化を解析し、neurocalcin Bの機能を明らかにしたい。

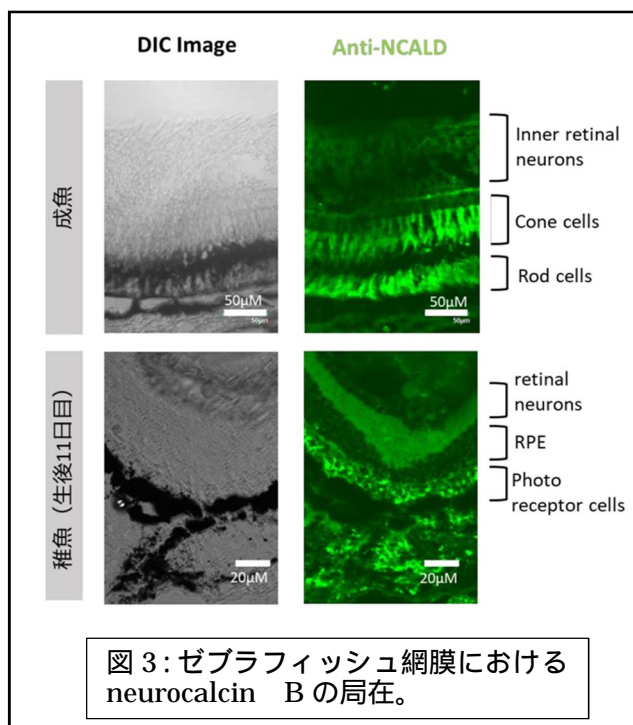


図3: ゼブラフィッシュ網膜における neurocalcin B の局在。

参考文献:

- 1)Fukagawa et al, "Purification of cone outer segment for proteomic analysis on its membrane proteins in carp retina." (2017) PLoS One. Mar 14;12(3):e0173908. doi: 10.1371/journal.pone.0173908.
- 2)Hayashi et al, "Raftophilic rhodopsin-clusters offer stochastic platforms for G protein signalling in retinal discs" (2019) Commun Biol. Jun 14;2:209. doi: 10.1038/s42003-019-0459-6. eCollection 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Asano Teizo, Kawamura Satoru, Tachibanaki Shuji | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Transducin activates cGMP phosphodiesterase by trapping inhibitory subunit freed reversibly from the catalytic subunit in solution | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 e7245 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-43675-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Dhankhar D, Nagpal A, Tachibanaki S, Li R, Cesario TC, Rentzepis PM. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Comparison of Bovine and Carp Fish Visual Pigment Photo-Intermediates at Room Temperature | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Photochem. Photobiol. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/php.13621 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Kawamura S, Tachibanaki S. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Molecular bases of rod and cone differences. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Prog Retin Eye Res. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.preteyeres.2021.101040 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 橘木修志、妹尾圭司、松井建樹、上田昌宏 |
| 2. 発表標題 錐体・桿体視細胞の外節における脂質環境の解析 |
| 3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岸野桃子、上田昌宏、橘木修志 |
| 2. 発表標題 錐体細胞におけるNeurocalcin-deltaBタンパク質の機能的役割 |
| 3. 学会等名 日本動物学会第91回大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 浅野禎三,河村悟,橘木修志 |
| 2. 発表標題 ウシガエル桿体におけるホスホジエステラーゼ活性化機構の解析 |
| 3. 学会等名 日本動物学会第90回年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 橘木修志 |
| 2. 発表標題 視細胞での暗所視・明所視の分子基盤視細胞での暗所視・明所視の分子基盤 |
| 3. 学会等名 異分野融合による次世代光生物学研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 門松恭子,岸野桃子,妹尾圭司,伊藤有基,河村悟,橘木修志 |
| 2. 発表標題 The effect of lipid environment of outer segment membranes on the activation of photoreceptor-specific G protein, Transducin |
| 3. 学会等名 日本比較生理生化学会41回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岸野桃子、上田昌弘、橘木修志 |
| 2. 発表標題 Analysis of the Functional role of Neurocalcin-deltaB in Photoreceptor Cone Cells |
| 3. 学会等名 比較生理生化学会第43回オンライン札幌大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西田菜々穂、妹尾圭司、上田昌弘、橘木修志 |
| 2. 発表標題 The effect of the spatial distribution patterns of lipids on photoresponses of rod photoreceptors |
| 3. 学会等名 比較生理生化学会43回オンライン札幌大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 橘木修志、西田菜々穂、妹尾圭司、上田昌弘 |
| 2. 発表標題 The effect of lipid distribution in the outer segment membranes on photoresponses of bullfrog rod photoreceptor cells. |
| 3. 学会等名 日本動物学会第92回オンライン米子大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|-------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 橘木修志 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 大阪大学生産技術研究会 | 5. 総ページ数 3 |
| 3. 書名 生産と技術,72(3), 61-63, (2020) | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 橋木修志 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 中外医学社 | 5. 総ページ数 4 |
| 3. 書名 Clinical Neuroscience 2019年12月号 項目「視細胞の光応答メカニズムにおける暗所視と明所視の分子基盤」 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 妹尾 圭司 (Seno Keiji) (50283908) | 浜松医科大学・医学部・准教授 (13802) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|