

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6月15日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570174

研究課題名（和文） 視覚サイクルにおけるレチナールの再異性化の分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular Mechanism of re-isomerization of retinal in visual cycle

研究代表者

津田基之（TSUDA, MOTYUKI）

徳島文理大学・香川薬学部・客員教授

研究者番号：60045458

研究成果の概要（和文）：

視覚サイクルにおける、レチナールの再異性化の分子メカニズムを明らかにする目的でヒトのモデル動物としてその最も原始型である脊索動物ホヤを用いた。

無脊椎動物ではレチナールの光異性化酵素レチノクロームが機能しており、脊椎動物では暗異性化酵素RPE65が視覚サイクルを担っている。ホヤにはレチノクロームのホモログであるCi-opsin3とRPE65のホモログCi-RPE65があるが、Ci-opsin3が光異性化することを確認できたが、Ci-RPE65は暗中で11-シス型レチナールに異性化する活性は見出すことはできなかった。この結果はホヤではCi-RPE65は存在するが、暗異性化の機能は出来ていないと考えられ、進化的に興味ある結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Absorption of a photon by visual pigments induces isomerization of 11-cis-retinaldehyde (RAL) chromophore to all-trans-RAL. Here we compare visual retinoid cycles between different photoreceptors of vertebrates as well as invertebrates. The visual cycle systems in ascidians, the closest living relatives of vertebrates, show an intermediate state between vertebrates and non-chordate invertebrates. The ascidian larva may use retinochrome-like opsin as the major isomerase retinal but RPE65 in ascidian did not isomerase retinal. These results are very interesting in the evolutionary standpoints.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物系

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：視覚サイクル、レチナール、

1. 研究開始当初の背景

視覚は網膜の視物質ロドプシンが光を受

容して、視細胞内の情報伝達系が駆動して成立する。ロドプシンの発色団 11-シス型レチナールは光受容により全トランス型に異性化後、オプシタンパク質とレチナールに分解する。従って、視覚を維持するためには全トランス型レチナールを 11-シス型レチナールに再異性化してロドプシンを再生する仕組みが存在しこれを視覚サイクルという。脊椎動物では視興奮は視細胞で、視覚サイクルは網膜色素上皮細胞でおこなわれ、多くのタンパク質が関与しているが、本研究では視覚サイクルにおける、チナールの再異性化の分子メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

方法 1 レチナール異性化タンパク質のホールマウント免疫染色

カタユウレイボヤ幼生は 10 % ホルマリン／人工海水で 4℃、3 時間固定した。ロッキング液で 1000 倍希釈した 1 次抗体（抗 Ci-opsin1 抗体 [視細胞外節のマーカー]、抗 Ci-arr 抗体 [視細胞のマーカー]、抗 Ci-opsin3 抗体、抗 Ci-CRALBP 抗体、抗 Ci-BCO 抗体、抗 Ci-RPE65 抗体）と 4℃、8 時間以上反応させた。2 次抗体（Alexa 488 標識された抗マウス（或はウサギ）IgG ヤギ抗体）と 4℃、8 時間以上反応させた。PBT で試料を 8 時間以上洗った後、50 % グリセロール/PBT に封入し、共焦点顕微鏡（LSM 510; Carl Zeiss, Jena Germany）で観察を行った。

脳胞内での視細胞との関係を見るために、カタユウレイボヤ視細胞マーカーである Ci-arr と視覚サイクルタンパク質との二重染色を行った。また、抗 Ci-BCO 抗体はマウス IgG で、抗 Ci-opsin3 抗体と抗 Ci-CRALBP 抗体はウサギ IgG なので、二重染色が可能であり、Ci-BCO と Ci-opsin3 或は Ci-CRALBP の視細胞での共局在様式が観察できた。二重染

色では、2 次抗体として Alexa 488 標識された抗マウス（或はウサギ）IgG ヤギ抗体と Alexa 594 標識された抗マウス（或はウサギ）IgG ヤギ抗体（Molecular Probes, Inc., Eugene, OR Molecular Probes, Inc., Eugene, OR）を使用して、同様に免疫染色を行い、観察した。

2) Ci-BCO と Ci-RPE65 の HEK 細胞での発現と機能解析

LRAT と CRALBP 両方を恒常的に発現する細胞（HEK293T-LC）に HEK293T-LC 細胞に、ウシ RPE65 (brRPE65)、Ci-RPE65、Ci-BCO を別々にプラスミド pRK5 に組み込んで、別々の HEK293T-LC 細胞にトランスフェクションして発現させた。これらの遺伝子を組み込まないベクター pRK5 をコントロールとしてトランスフェクションに用いた。

4. 研究成果

本研究で視覚サイクルにおける、チナールの再異性化の分子メカニズムを明らかにする目的でヒトのモデル動物としてその最も原始型である脊椎動物ホヤを用いた。

無脊椎動物頭足類ではレチノクロームが全トランスレチナールを光により 11-シス型に異性化することにより視覚サイクルが成り立っている。脊椎動物にもそのホモログである光異性化酵素 RGR が存在するが、視覚サイクルには暗異性化酵素 RPE65 が視覚サイクルを担っていることが明らかとなった。ホヤにはレチノクローム、RGR のホモログである光異性化酵素 Ci-opsin3 が存在する。さらに、暗異性化酵素 RPE65 のホモログ Ci-RPE65 もあり、ホヤの視覚サイクルはどちらが機能しているかは脊椎動物の視覚サイクルを明らかにする上で重要である。

視細胞内での視覚サイクルタンパク質の局在

カタユウレイボヤ幼生の光受容システムでは、視細胞外節に位置する Ci-opsin1 が視物質オプシンにあたる。発色団の 11-シスレチナールは光を受容して全トランスレチナールになり、11-シスレチナールの再生が頭

足類では視細胞内で、脊椎動物では網膜色素上皮細胞で行われる。頭足類では視細胞内で細胞レチナル結合タンパク質 (RALBP) がレチノイドを運搬し、レチノクロームが光依存的に異性化を行う。脊椎動物では全トランスレチノールが視細胞から網膜色素上皮へ移った後、RPE65 が異性化を行い、その後細胞内でCRALBPが11-シスレチノイドを運搬する。レチノクロームは脊椎動物ではRGRが、カタユウレイボヤではCi-opsin3が同じ機能を持つことが知られている。カタユウレイボヤではRALBPは同定されていない。異性化酵素としてはCi-RPE65は幼生で局在がなく、Ci-opsin3が幼生の脳胞と視細胞に局在があるので、幼生では、頭足類でのレチノクロームのようにCi-opsin3が異性化を行っていると考えられる。そのとき、異性化が行われる場所は脊椎動物のように視細胞とは別の細胞で行われるのか、頭足類のように視細胞内で行われるのかという点を解明するために、視細胞のマーカーとして抗Ci-arr抗体を用い、視覚サイクルタンパク質に対する抗体と二重染色を行った(図1)。

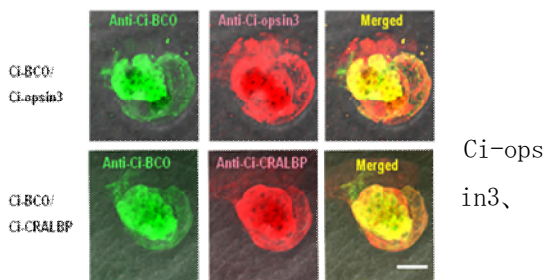


図1の説明

Ci-BCOとCi-opsin3またはCi-CRALBPの二重染色。左列は抗Ci-BCO抗体で標識した細胞(緑色)。中列上が抗Ciopsin3抗体で、中列下が抗Ci-CRALBP抗体で標識した細胞(赤色)。右列は抗Ci-BCO抗体標識(左列; 緑色)と抗Ciopsin3抗体(上)または抗Ci-CRALBP抗体(下)標識(中列; 赤色)を重ねた写真。視覚サイクルタンパク質の共局在は黄色で示されている。スケール

バー = 20 μm

Ci-CRALBPの他に、幼生視細胞での局在がみられたCi-BCOの局在も調べた。Ci-opsin3、Ci-CRALBP、Ci-BCOはいずれも視細胞の細胞体部分で多く局在していた。Ci-opsin3は脳胞で広範囲に分布していた。Ci-CRALBPとCi-BCOは、脳胞の周辺の一層の細胞層が染まっていた、その内側は前方の方では染まっていなかった。Ci-BCOは神経終末でも多く局在し、Ci-opsin3とCi-CRALBPはあまりみられなかった。

脊椎動物の視覚サイクルには暗異性化酵素RPE65が重要であることを明らかにした研究協力者であるSing博士にCi-RPE65の遺伝子を送り、培養細胞でタンパク質を発現して頂いた

それぞれの発現させたタンパク質(ウシRPE65、Ci-RPE65、Ci-BCO)に全トランスレチナルを与えたところ、ウシRPE65では11-シスレチノールが得られた(図4-2)。Ci-RPE65、Ci-BCO、タンパク質を発現させなかったベクターのみのネガティブコントロールでは11-シスレチノールが得られなかった。13-シスレチノールと9-シスレチノールはどの試料でも同じくらいのレベルで得られた。

脊椎動物とは異なり、ホヤではレチノールやレチニルエステルは殆どみられず、レチナルが主要な異性体である(Irie et al. 2004)。そこで、次に、アルコールの全トランスレチノールではなく、アルデヒドの全トランスレチナルを与えて、Ci-RPE65とCi-BCOの異性化酵素活性をみたが、11-シスレチノイドは生成されず、活性はみられなかった。

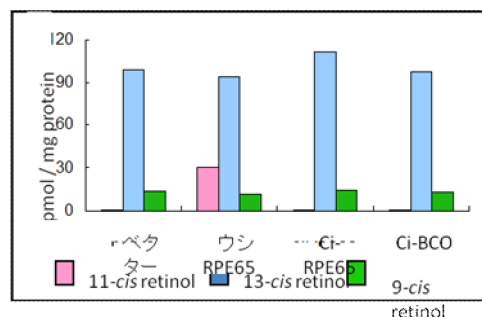


図2の説明

Ci-RPE65とCi-BCOの異性化酵素活性。HEK293T-LC細胞にウシRPE65、Ci-RPE65、Ci-BCOのいずれかを発現させて、全トランスレチノールを与えたとき発生したレチノール異性体。ベクターは、RPE65やBCOを組み込んでいないpRK5プラスミドを導入したHEK293T-LC細胞。ウシRPE65のみで11-シスレチノールが生成された。

発現したCi-opsin3とCi-RPE65をCi-opsin3、Ci-RPE65の抗体により、このタンパク質が交差反応をすることを確認できた。Ci-opsin3が光異性化することを確認できたが、Ci-RPE65が全トランス型レチノールを暗中で11-シス型レチノールに異性化する活性は見出すことはできなかった。この結果はホヤではCi-RPE65は存在するが、暗異性化の機能は出来ていないと考えられ、進化的に興味ある結果が得られた。

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6件)

- ① Kusakabe, T., Takimoto, N., Minghao Jin, M., Tsuda, M.; Evolution and the origin of the visual retinoid cycle in vertebrates. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 査読有り B 364 2897-2910, 2009
- ② Dong, B., Horie, T., Denker, E., Kusakabe, K., Tsuda, M., Smith, W., Jiang, D., Tube formation by complex cellular processes in Ciona intestinalis notochord, Dev. Biol., 査読有り 330 (2) 2009, 237-249
- ③ Sakai, T., Aoyama, M., Kusakabe, K., Tsuda, M., Satake, H, Functional Diversity of Signaling Pathways through G Protein-Coupled Receptor Heterodimerization with a Species-Specific Orphan Receptor Subtype, Mol. Biol. Evol. 査読有り, 27(5) 2010 1097-1106
- ④ Tresser J, Chiba S, Veeman M, El-Nachef D, Newman-Smith E, Horie T, Tsuda M., Smith WC, doublesex/mab3 related-1 (dmrt1) is essential for development of anterior neural plate derivatives in Ciona

a. Development, 査読有り, 37(13), 2010, 197-203

⑤ Horie T, Nakagawa M, Sasakura Y, Kusakabe TG, Tsuda M., Simple motor system of the ascidian larva: neuronal complex comprising putative cholinergic and GABAergic/glycinergic neurons., Zoolog Sci, 査読有り, 27(2), 2010, 181-90

⑥ T. Sakai, M. Aoyama, T. Kusakabe, M. Tsuda, H. Satake, Evidence for differential regulation of GnRH signaling via heterodimerization among GnRH receptor paralogs in the protochordate, Ciona, Endocrinology, 査読有り, 153 2012, 1841-1849

[学会発表] (計2件)

- ① Zang, Kanda, Tsuda, Kouyama, Crystalization of octopus rhodopsin, 生物物理学会、2009年9月、アステイ徳島、徳島市
- ② 津田基之、視覚サイクルの分子メカニズム、生物物理学会中国四国支部大会、2010年5月、松山大学

[図書] (計1件)

針山孝彦、津田基之、共立出版、環境生物学-地球環境を守るには、2010、総頁261

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(1)

津田基之 (Tsuda, Motoyuki)

徳島文理大学 ・ 香川薬学部 ・ 客員教授

研究者番号 : 60045458

(2) 研究分担者

(0)

研究者番号 :

(3) 連携研究者

(2)

寺北明久 (Terakita, Akihisa)

大阪市立大学 ・ 理学研究科 ・ 教授

研究者番号 : 30212062

日下部 岳広 (Kusakabe, Takehiro)

甲南大学 ・ 理工学部 ・ 教授

研究者番号 : 40280862