

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650119

研究課題名(和文) 桿体視細胞の暗ノイズ低減メカニズムの解明に向けた新規アプローチ

研究課題名(英文) Biochemical analysis of low thermal isomerization mechanism of rod visual pigment.

研究代表者

七田 芳則 (Shichida, Yoshinori)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60127090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ロドプシンは非常に安定なタンパク質であり、それに含まれる発色団の熱異性化の頻度は極端に小さい。そのため、ロドプシンを含む桿体視細胞は1個の光子に応答できるほど高感度である。本研究で我々は生化学的手法でロドプシン発色団の熱異性化速度を測定する方法を新たに開発した。その結果、ロドプシンは錐体視物質からの分子進化過程で2つの鍵となるアミノ酸残基を獲得し、熱異性化速度を約1/1000に抑えていることがわかった。また、両生類の緑桿体に発現する青色感受性錐体視物質は、先の2つとは別の位置にアミノ酸変異を起こし、ロドプシンと同様の低い熱異性化速度を有することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Low dark noise is a prerequisite for rod cells, which mediate our dim-light vision. The low dark noise is achieved by the extremely stable character of the rod visual pigment, rhodopsin, which evolved from less stable cone visual pigments. We have developed a biochemical method to quickly evaluate the thermal isomerization rate of the chromophore in visual pigments. Using an isomerization locked chromophore, we confirmed that thermal isomerization rate of the chromophore in rhodopsin is about 1/1000 of that of cone visual pigment and identified two critical residues (E122 and I189) in the chromophore binding pocket which account for the extremely low thermal activation rate of rhodopsin. Furthermore, we found that anura blue-sensitive cone visual pigment expressed in green rods acquired the low thermal isomerization rate of the chromophore by the specific mutation during the molecular evolution, which led to optimization for scotopic vision.

研究分野：分子生理学

キーワード：視物質 視細胞 暗ノイズ 生化学的方法 分子進化

1. 研究開始当初の背景

視細胞には視物質に始まる光シグナル伝達系があり、これに関与する機能性タンパク質の分子進化・多様化により、細胞機能の多様化が起こったと考えられる。申請者はこれまで桿体視物質(ロドプシン)と錐体視物質との分子特性の違いを、変異体を含めて種々の分光学的・生化学的手法により解析し、桿体・錐体視細胞の応答特性の違いの分子基盤をどこまで明らかにできるかに取り組んできた。さらに、ノックインマウスを作製することにより、両視物質のどの分子特性の違いが視細胞の生理機能の違いに関与しているかを電気生理学的にも検討してきた。その結果、視物質の分子進化の最後に分岐してきたロドプシンが、視細胞の光感受性を上げ、また、暗ノイズを大幅に下げることによって、単一光子計測機能(1個の光子の受容で応答できる機能)をもつ桿体視細胞の形成に寄与したことを示した。しかし、ロドプシンへの進化から視細胞の進化を理解するには、どのようなアミノ酸残基の置換により上記の機能が実現したのかを明らかにする必要があるのである。光感受性の増大のメカニズムについては、視物質の反応を視細胞内環境を模倣した実験条件下で測定することにより、Gタンパク質活性化効率の増大がその原因であることがわかった。したがって、申請者らがこれまで行っている研究手法を展開することにより、その分子メカニズムの解析が可能であることがわかった。一方、暗ノイズの低減メカニズムについては、電気生理学的手法を用いた研究ストラテジーは直接的であるが、それを実際に行うことは不可能に近い。つまり、暗ノイズの分子メカニズムを検討するには、アミノ酸残基を置換した変異体を利用した研究が必須であるが、変異体を桿体に発現するノックインマウスを作製するには最低でも1年以上の年月がかかる。したがって、系統的で網羅的なノックインマウスの作製が必須である電気生理学的方法では、そのコストと時間が膨大になり、現実的な実験計画とはならない。そこで、新しい方法論の確立に挑戦し、メカニズムを解明することを試みる。

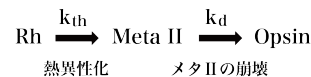
2. 研究の目的

本研究では「暗ノイズの低減メカニズム」を検討するために、ロドプシンや錐体視物質によるGタンパク質の微少な活性化を測定する生化学的手法を詳細に検討して最適化し、これまで電気生理学的手法でのみ測定が可能と考えられてきた視細胞の暗ノイズの測定に挑戦する。また、網羅的な変異体解析により暗ノイズを制御するメカニズムを明らかにする。さらに、開発した方法を両生類の緑桿体の応答特性の解析に適用し、視物質の分子進化に関与するアミノ酸変異について解析する。

3. 研究の方法

本研究では、視物質の熱異性化に由来する活性状態の生成量を、活性化されるGタンパク質に取り込まれた放射性ラベルしたGTP Sの量をもとに決定する。

暗ノイズの応答プロファイルは視細胞の単一光子応答に由来する応答プロファイルと区別がつかない。つまり、暗ノイズは視物質の発色団が熱的に異性化することにより、光で異性化する場合と同様の活性状態を生成して後続のシグナルカスケード系を駆動すると考えられる。生成した活性状態(メタII)はレチナルとオプシンに分解するので、発色団の熱異性化反応とメタIIの崩壊反応の反応速度を k_{th} 、 k_d とすると、



と書くことができる。この反応でロドプシンの熱活性化の速度は時定数が150年程度と考えられ、メタIIの崩壊の時定数(数十秒)に比べて極端に大きい。したがって、 $k_{th} \ll k_d$ と考えられ、測定時間中には熱異性化によって生成したメタIIが非常に少ないが一定量存在すると考えることができる。つまり、定常状態近似が可能となり、試料中のメタIIの濃度([MII])は、ロドプシンの初期濃度を $[\text{Rh}]_0$ とすると、 $[\text{MII}] = (k_{th}/k_d)[\text{Rh}]_0$ と計算することができる。熱異性化により定常的に生成するメタIIの濃度とロドプシンの初期濃度の比は、このメタIIにより活性化されたGタンパク質の生成速度(V_{th})と実験に用いた試料中のロドプシンを光ですべてメタIIに変化させた時に活性化されるGタンパク質の生成速度(V_{light})の比を求めることで決定できる。すなわち、 $V_{th} = (k_{th}/k_d)V_{light}$ である。以上の計算と実験により k_{th} を求めることができる。

4. 研究成果

ロドプシン・錐体視物質、およびそれらの変異体を試料とした熱異性化速度の測定。

(1) 実験に用いる試料の検討

これまでの多くの実験から、視物質は膜蛋白質であり、その分子特性は周りの環境(膜環境が界面活性剤で抽出した状態か)でかなり変化することがわかっている。発色団の熱異性化反応についても、周りの環境によって変化する可能性が高いので視細胞そのものを試料として実験を行うことが理想である。しかし、実験に供する動物の網膜にはウシの網膜でも数%の錐体が含まれていることから、網膜から桿体外節を分離して試料とすると錐体視物質の混在を避けることができない。申請者らのノックインマウスでの実験により、錐体視物質の暗ノイズ(熱異性化)の頻度はロドプシンに比べて1000倍程度大きいので、たとえ1%の混在でも実験結果に大きな影響を及ぼす可能性がある。そこで、実験

としては、培養細胞系で作製した視物質のリコンビナント体を試料とした。培養細胞系で発現する場合、遺伝子が利用可能であれば視物質試料を得るのが困難な動物の視物質も実験試料として作製することができる。

培養細胞系で発現させた視物質を試料とする場合、以下の3つの選択肢が考えられる。すなわち、培養細胞の形質膜試料をそのまま利用する。界面活性剤で抽出して利用する。生体膜環境を模倣したナノディスクに埋め込んで利用する。このうち、ロドプシンの実験ではの可能性も検討できるが、錐体視物質を実験材料とする場合には培養細胞系での発現量が少ないためノイズが増えることが予想される。したがって、の調製法は除外した。また、のナノディスクの調製には多くのステップがあるので、その過程で視物質（特に錐体視物質や変異体）の一部が変性し、ノイズとなる可能性がある。そこで、最初の試みとしては、の調製法で行うことにした。

異性をせずオプシン活性を抑えるレチナルアナログについては、申請者らのこれまでの研究から、5員環レチナル、7員環レチナル、および8員環レチナルを利用することが考えられた。これらの中で、7員環レチナルがこれまでの研究結果も多く、また、安定な色素を形成することが予想された。そこで、7員環レチナルをレチナルアナログとして利用することにした。

(2) 試料の熱異性化速度の測定

上記に示した実験試料を用いてロドプシン発色団の熱異性化に由来するGタンパク質へのGTP γ Sの取り込み量を測定した。その結果、7員環レチナルと結合させたオプシンではGタンパク質の活性化は観測されず、天然のレチナルと結合させたオプシンからは活性化が有意に観測された(図1)。以上の結果から、上記の実験条件でロドプシン発色団の熱異性化(メタの生成)に由来するGタンパク質の活性化(V_{th})を観測できることがわかった。

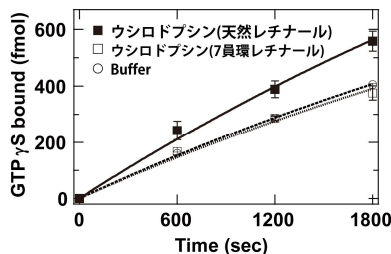


図1: ロドプシン発色団の熱異性化に由来するGTP γ Sの取り込み量

次に、生成したメタの崩壊速度を測定するために、光子カウンティングモード蛍光測定装置を用いて、メタの崩壊(オプシン生成)に伴う蛍光強度の増大速度(kd)を測定した。さらに、同じ測定装置を用いて、ロドプシンを光照射して全てのロドプシン

をメタ(活性状態)に変化させた時のGタンパク質の活性化速度(V_{light})を測定した。最終的に、これら3つの値から視物質発色団の熱異性化の速度を計算した(図2)。また、同様の実験を錐体視物質を試料として行った。興味深いことに、ロドプシンと錐体視物質では熱異性化の頻度に大きな違いがあり、両者の比は電気生理学的に観測されていた値に近いことがわかった。

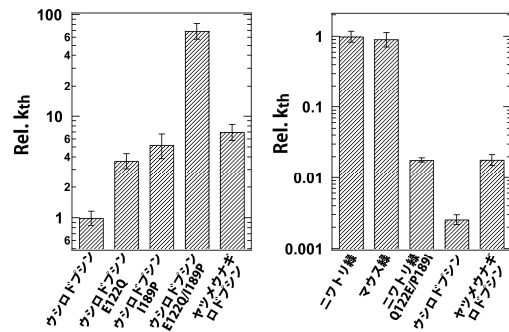


図2: 視物質および変異体の発色団の熱異性化速度

次に、ロドプシンおよび錐体視物質の変異体を試料として同様の実験を行い、ロドプシンと錐体視物質の熱活性化速度の違いに関わるアミノ酸残基を探索した。その結果、2つの残基の関与が明らかとなった。興味深いことに、この2残基はロドプシンと錐体視物質の活性状態の寿命に関わる残基として既に同定していたものであった。つまり、この2つの残基は、暗状態と活性状態の両方の分子特性に大きく影響する残基であることがわかった(図3)。

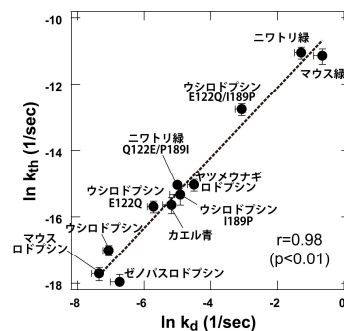


図3: 視物質の活性状態の速度と熱異性化速度

両生類の緑桿体に含まれる青感受性錐体視物質の熱異性化速度の測定

多くの脊椎動物の網膜には、1種類の桿体視細胞と複数種の錐体視細胞が含まれる。しかし、カエルやサンショウウオの中間の網膜は2種類の桿体視細胞を含み、それらは赤桿体、緑桿体と呼ばれている。最近の研究から、2種類の桿体視細胞のうち、赤桿体は他の脊椎動物が持つ桿体と同様、視物質としてロドプシンを持つが、もう1つの緑桿体には青感受性の錐体視物質が含まれていることが発見された。また、電気生理学的な研究から、カエルの緑桿体は赤桿体と同様の暗ノイズ

や光感受性を示すが、サンショウウオの緑桿体は錐体視細胞と同様の応答特性を持つことが知られている。そこで、我々は、カエルおよびサンショウウオの緑桿体に含まれる青錐体視物質発色団の熱異性化速度を生化学的手法で測定した。その結果、カエルの青錐体視物質はロドプシンと同様の熱異性化速度を示すが、サンショウウオの青錐体視物質はロドプシンに比べて数百倍の熱異性化速度を示し、この値は、ゼブラフィッシュの青錐体に含まれる青色錐体視物質と同様であった。以上の結果から我々は、カエルの青錐体視物質は分子進化の過程で、ロドプシン様の分子特性を獲得し、カエルは暗い環境で色識別ができる可能性があることを推定した。一方、サラマンダーの緑桿体は赤桿体に比べて閾値が高く、暗い環境で赤桿体と共同して働くまでには最適化していない可能性が示唆された。また、変異体解析により、カエル青錐体視物質の暗ノイズの低減に關するアミノ酸残基を同定した。

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15件)

Yanagawa M, Kojima K, Yamashita T, Imamoto Y, Matsuyama T, Nakanishi K, Yamano Y, Wada A, Sako Y, Shichida Y. Origin of the low thermal isomerization rate of rhodopsin chromophore. Sci Rep. 2015 5:11081. doi: 10.1038/srep11081.

[学会発表](計52件)

Shichida Y, Thermal isomerization of chromophore in rod and cone visual pigments. Pacificchem 2015 Honolulu (USA) (2015 Dec. 19)

Shichida Y, Molecular evolution of the low thermal isomerization rate of rhodopsin chromophore. 7th AACP Taipei (Taiwan) (2015 Nov. 18)

松谷優樹、小島慧一、柳川正隆、山下高廣、今元泰、山野由美子、和田昭盛、七田芳則 「両生類の緑桿体に含まれる青色錐体視物質の熱活性化頻度」日本動物学会第86回大会 新潟 (2015 Sept. 19)

小島慧一、柳川正隆、山下高廣、松谷優樹、今元泰、松山オジヨス武、中西香爾、山野由美子、和田昭盛、佐甲靖志、七田芳則 「視物質の低い熱活性化頻度をもたらす分子メカニズム」日本生物物理学会第53回年会 金沢 (2015. Sept. 13)

Shichida Y, Molecular properties associated with the physiological function of visual pigment. Osaka

University International Symposium on Sensory Signal Transduction and Information Processing, Osaka, (2015.March.20)

柳川正隆、小島慧一、山下高廣、今元泰、松山オジヨス武、中西香爾、山野由美子、和田昭盛、佐甲靖志、七田芳則 「ロドプシン発色団の低い熱異性化速度の生化学的測定」日本動物学会第85回大会 仙台 (2014. Sept. 11)

小島慧一、柳川正隆、山下高廣、今元泰、松山オジヨス武、中西香爾、山野由美子、和田昭盛、佐甲靖志、七田芳則 「ロドプシンの低い熱活性化頻度の分子メカニズム」日本生物物理学会第52回年会 札幌 (2014. Sept. 25)

七田芳則 「視物質・オプシン類の光生物学的研究」日本光生物学協会 協会賞受賞講演 大阪 (2014. 23.Aug.)

[図書](計3件)

七田芳則他 朝倉書店 光と生命の辞典 2016 422

Sato K. and Shichida Y. Springer "Evolution and Diversity of Visual pigments in Connection with Their Functional Difference" in Vertebrate Photoreceptors 2014 349

[産業財産権]

出願状況(計0件)

なし

[その他]

ホームページ等

http://photo1.biophys.kyoto-u.ac.jp/shichida/home_jp.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

七田 芳則 (SHICHIDA, Yoshinori)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：60127090