1P137

マダコ表皮に発現するオプシン類似遺伝子の検索

○岩佐 達郎¹、房岡 恵理²、赤松 昭尚¹、津田 基之² (¹室蘭工大・材料物性・生体分子科学、²姫路工大・理・生命科学)

我々はタコロドプシン遺伝子の発現の組織特異性を調べる目的で、マダコの種々の組織由来の全RNAを用いてノーザンブロットを行ったところ、眼以外にも、表皮由来の全RNAにタコオプシン遺伝子プローブによって認識される複数のバンドを見いだした。調べた限りでは、視葉、脳を含むその他の部位由来の全RNAからはシグナルを検出できなかった。この結果はマダコ表皮にオプシン類似遺伝子が発現していることを示唆するものである。タコが体色変化を示すことは良く知られている。しかし、現在の所、タコの眼には形態学的に1種類の視細胞、分子としても1種類のオプシン遺伝子しか検出されていない。もし、タコが外界の色情報に基づいて体色変化するのなら、1種類の視色素というのは考えにくい。また、近年、ジェノバスの表皮黒色素胞からオプシングループに属するメラノプシンの遺伝子が得られている。そこで、我々は、タコ表皮に体色変化に関係する光受容タンパク質が存在しているのではないかと考え、これについて調べることにした。まず、マダコ表皮由来のcDNAライブラリーを作成した。このとき、マダコの種々の部位から表皮を取り、オプシンプローブによりノーザンを行ったが、部位によるシグナル強度の明確な差は認められなかった。特にライブラリーを作成する表皮の部位にはこだわらなかった。作成したcDNAライブラリーをタコオプシン全長プローブでスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、35%ホルムアルデヒド存在下、42℃で一夜おこなった。その結果、シグナル強度の異なる複数の陽性シグナルが認められた。3回のスクリーニングによって、9個のシングルファージを得た。現在これらについて解析を進めているので、その結果を報告したい。

T.Iwasa, E.Fusaoka, A.Akamatsu and M.Tsuda : Opsin-like genes expressed in octopus epidermis

1P139

truncated タコロドプシンの単離法

○井上 明美^{1,2}、津田 基之¹ (¹姫路工業大学・理、²JASRI)

昨年ウシロドプシンが結晶化され、その立体構造が明らかにされた。脊椎動物ロドプシンは光を受容すると不可逆的に反応が進行する。一方、無脊椎動物であるタコのロドプシンはメタロドプシンが生理温度で安定であり、さらに赤色光を照射することにより元のロドプシンに可逆的に変換する性質を持っている。我々はタコロドプシンの構造を決定し、ウシロドプシンの構造と比較することで光安定性や光可逆性等の異なる性質のメカニズムを明らかにしたいと考えている。しかし、タコ視細胞膜には分子量の異なるロドプシンアイソフォーム(50kDa、51kDa、52kDa)が存在するため、良質な結晶を得るのは困難である。この分子量の違いは頭足類に特徴的なC末端にあると考えられる。C末端約10kDaを取り除いた約40kDaのtruncated タコロドプシンはSDS-PAGE上シングルバンドであり、Gタンパク質の活性化能、ロドプシンナーゼによるリン酸化などロドプシンの機能を有している。本研究ではタコロドプシンの結晶化を目指して短時間で大量にtruncated タコロドプシンを単離精製することを試みた。タコ視細胞膜にリシルエンドペプチダーゼを作用させた後、ウシロドプシン結晶化で用いられた精製方法を参考にしてNonyl-glucosideを用いて可溶性による精製を行った。タコロドプシンはウシロドプシンと同様の条件では変性を生じたため、希釈により塩濃度を低下させ速心分離を行った。その結果、さらに精製度が上がり安定性も良好となった。俵雑タンパク質を取り除かれたロドプシンは3つのアイソフォームと約40kDaのロドプシンが混在していたため、硫酸分画(43%飽和硫酸)で両者を分離した。このようにして均一なtruncated タコロドプシンの標品を短時間で得ることに成功した。

A.Inoue, M.Tsuda : Purification of truncated octopus rhodopsin

1P138

イカロドプシンの迅速な精製法

○堀込 哲史¹、北原 玲¹、神山 勉^{1,2} (¹名大院・理・物理、²理研・播磨)

イカロドプシンはイカ視床下部の光受容細胞に存在する分子量約5万の光受容膜蛋白質である。無脊椎動物の光受容細胞は側面にある細胞膜が変形して横に突き出した微絨毛を形成しており、ロドプシンはその微絨毛の脂質二重膜中を貫通する形で存在する。イカロドプシンを選択的可溶性によって精製し、その結晶化を試みている。これまでの研究においてすでに微結晶を得ている。これは、Tween20、CHAPSを用いて微絨毛膜から脂質を粗く除去し、オクチルグルコシドを使ってロドプシンを抽出した後、界面活性剤を除去することによって得られる。選択的に抽出されたロドプシンはオリゴマー状態になっており、直径数十nmの微細な球状構造体を形成する。微結晶を電子顕微鏡で観察すると、これが密に寄り集まって線状や球殻状の様々な形態をとっているのが見える。微結晶には球状構造体のやや規則的な配列が見えはするが、X線結晶構造解析に適した結晶とはいえない。より良質な結晶を得るためには、ロドプシンの精製方法の改良が必要であると考えている。界面活性剤による選択的可溶性を行うことで、より簡便で迅速な精製法の開発を目指して研究を進めている。具体的には界面活性剤や塩の種類・濃度により、微絨毛膜や膜蛋白質がどのような様態を示すのかを調べ、良質な結晶を得るための精製法を探索した。各可溶性段階のロドプシンの集合状態を電子顕微鏡および原子間力顕微鏡により観察し、その結果を参照しながら結晶化に適した精製法の開発・改良を企てている。

A.Horigome, R.kitahara and T.kouyama : Rapid purification of squid rhodopsin

1P140

脊椎動物の視細胞はなぜ過分極性応答か? ホヤ幼生の遺伝子と行動解析から

○津田 基之、川上 功、日下部 りえ、日下部 岳広 (姫路工大・理・生命)

ほとんどの興奮性細胞が刺激により脱分極性の応答をするのに対して、脊椎動物視細胞は光刺激により過分極性の応答をする。この脊椎動物視細胞の過分極性応答の起源は不明であった。今回我々はホヤの視物質の遺伝子解析、視細胞の光応答、幼生の光に対する行動解析に基づいて、この問題に対する作用仮説を示す。アフリカツメガエルは特定の幼生期に減光により遊泳行動を示す。Robertらは電気生理、行動実験からこの減光に対する応答が眼でなく松果体によることを示した。原索動物ホヤの幼生は脳胞の内部に3つのレンズ細胞、1つの細胞からなる眼杯、約20個の光受容細胞からなる単眼を有する。この光受容細胞が脊椎動物と同様に光に対して過分極性の応答であることが示されている。我々はホヤ幼生の光に対する行動を解析行ったら、アフリカツメガエルの幼生と同様、減光により遊泳行動を開始することを見いだした。さらに、明刺激で遊泳行動を停止する。このことはホヤの単眼はアフリカツメガエルの幼生の松果体と同じ機能を有していると考えられる。今回我々はホヤの視物質のcDNAを単離し、推定されるアミノ酸配列から分子系統樹を作成したところ脊椎動物型のオプシンファミリーに属するが、眼のオプシンより脳内のオプシンのクラスに属することが明らかとなった。これらの結果から最も原始的な脊椎動物であるホヤの眼点は松果体の祖先型であることが分かる。松果体光受容細胞は明条件で静止しておりイオンチャネルが閉じている。暗刺激でイオンチャネルが開き、脱分極し神経終末からトランスミッターが放出し後の続く神経回路網を駆動する。脊椎動物の両眼この松果体眼の性質を受け継ぎ、結果的に光刺激により過分極性応答をするようになったと考えられる。

M.Tsuda, I.Kawakami, R.Kusakabe, T.Kusakabe : Why vertebrate visual cell is hyperpolarized?