B653

桿体視細胞のロドプシンを緑錐体視物質に置換したマウスモデルの構築

○桜井 啓輔^{1,3}、今井 啓雄^{1,3}、大西 暁士^{1,3}、千坂 修²、七田 芳則^{1,3} (1 京大・院理・生物物理、² 京大・生命科学、³ CREST・JST)

多くの脊椎動物の網膜には暗所視を担う桿体と昼間視を担う錐体の2種類の光受容細胞(視細胞)が存在する。両視細胞には光受容蛋白質(視物質)に始まる相同なG蛋白質共役型の光情報伝達系があり、桿体と錐体の応答特性の違いはそれに関与する機能的蛋白質の性質の違いに起因すると考えられている。細胞内光情報伝達系の最上流に位置する視物質の性質を比較すると、両視物質の性質の違いは視細胞の応答特性の違いとよい相関を示す。すなわち、錐体視物質は桿体視物質に比べ、G蛋白質を活性化する状態(メタII中間体)の寿命は短く、11-cis retinalを結合する速度(再生速度)は速い。これら諸性質は、それぞれ視細胞の光感受性や暗順応速度の違いを生み出す要因となると考えられる。そこで、視物質の性質の違いが視細胞応答特性に果たす生理的意義を直接的に検証する為に、桿体視細胞で発現する視物質(ロドプシン)を錐体視物質に置換するマウスモデルを構築した。ノックインマウスは、ES細胞での相同組換えによってロドプシンの遺伝子座にマウス緑錐体視物質遺伝子を導入し作製した。まず、RT-PCRやウェスタンブロッティングを行い、導入マウス緑のmRNAや蛋白質の網膜での発現を確認した。また、ホモマウス網膜における免疫組織染色の結果、導入したマウス緑は桿体外節に局在しており、桿体外節のロドプシンがマウス緑に置換していることが示された。さらに、変異マウスの網膜より調製した桿体外節(ROS)を用いて分光学的に導入錐体視物質の発現を確かめた。このことから、桿体視細胞で発現するマウス緑はretinalを結合し光受容能を持つことが示唆された。本研究により、視細胞の光応答特性における視物質の役割を検証する新たなモデルが構築された。

K.Sakurai, H.Imai, A.Onishi, O.Chisaka and Y.Shichida : Generation of the cone opsin knock-in mice for the functional analysis of visual pigments in vivo.

B655

部位特異的変異蛋白質を用いた多様なロドプシン類の光産物における対イオンの比較解析

○寺北 明久^{1,2}、小柳 光正^{1,2}、宮田 隆¹、七田 芳則^{1,2} (1 京大・院理・生物物理、² CREST・JST)

多くのロドプシン類は、プロトン化シッフ塩基結合を介して発色団レチナールを結合し、可視光を受容している。シッフ塩基上のプロトンは不安定であるので、蛋白質内では対イオンと呼ばれる負電荷を持つアミノ酸残基がシッフ塩基のプロトンを安定化している。

ロドプシン類はアミノ酸配列の類似性から、トランスデューシン(Gt)共役型脊椎動物ロドプシン、Gq共役型無脊椎動物ロドプシン、Go共役型ロドプシンなど5つのサブクラスに大別される。Gt共役型のウシロドプシンの対イオンはN端から数えて113番目のグルタミン酸(Glu 113)であることが最初に決定された。私たちはGt共役型以外のロドプシン類では、Glu 113が保存されていないことから、多様なロドプシン類での対イオンの解析を行ってきた。その結果、Gt共役ロドプシン以外のロドプシン類ではGlu 181が対イオンとして機能しているのを見いだした。

ウシロドプシンでは、光受容にともないシッフ塩基からGlu 113対イオンへとプロトン移動が起こり、光産物は退色する。このプロトン移動がG蛋白質活性化状態への構造変化に必須であることが知られている。一方、Gt共役ロドプシン以外のほとんどのロドプシン類の光産物は退色しない。すなわち、シッフ塩基からGlu 181対イオンへのプロトン移動は起こらないと考えられる。そこで本研究では、対イオンの位置の違いと光反応との関連を調べるために、対イオンを消去した変異体や対イオンを181番目か113番目の位置に変位させた変異体等の解析を行った。得られた結果から、分子進化過程における対イオンのスイッチングと光産物の性質との関連についても議論する。

A. Terakita, M. Koyanagi, T. Miyata and Y. Shichida : Investigation of counterions in the photoproducts of various rhodopsins by site-directed mutagenesis

B654

錐体と桿体の視物質における中間体の崩壊速度、オプシンの生成速度、及び再生速度の比較解析

○桑山 成樹、今井 啓雄、森住 威文、七田 芳則 (京大・院理・生物物理、CREST・JST)

光を受容した視細胞の光応答が回復するには、視物質の再生が必要となる。視細胞内での視物質の再生には、

(1) 視物質の光反応中間体からオプシンとall-trans-retinalが生成する過程

(2) 生成したオプシンと11-cis-retinalが結合する過程

が関わってくると考えられる。これまで我々は、錐体および桿体の光回復過程と視物質の再生反応との関係に興味を持ち、主に(2)の過程を中心にして研究を続けてきた。今回(1)の過程も含めて検討し、両視細胞での光応答回復過程の違いを考察する足がかりを求めた。

(1)の過程を検討するため桿体(ニワトリロドプシン)及び錐体(ニワトリ緑)視物質について解析を行った。方法としては、11-cis-retinal存在下で視物質を光照射した後の再生反応等を可視分光法により測定し、また、反応中間体がオプシンとall-trans-retinalに分解する時にオプシンの蛍光強度が変化することを利用して、この過程を蛍光分光法により測定した。その結果、光を受容した視物質からオプシンが生成する速度は、ニワトリ緑の方が約1000倍速いことが分かった。光反応中間体はMIIもしくはMIIIからオプシンとall-trans-retinalに解離すると考えられる。今回、上記2つの視物質を試料として検討したところ、両者とも大部分がMIIIからの経路を経てオプシンに変化することがわかった。オプシンからの再生速度((2)の過程)だけではなく、今回明らかになった反応中間体からのオプシン生成速度の差も、錐体、桿体視細胞の光応答回復過程に重要な役割を果たしている可能性がある。上記の結果に加えてロドプシン、ニワトリ緑変異体のデータも併せ、錐体、桿体オプシンの生成・再生の分子メカニズムについて議論する。

S. Kuwayama, H. Imai, T. Morizumi, Y. Shichida : Comparative analysis of the decay of meta-intermediate, the formation of opsin and the regeneration between rod and cone pigments

B656

ウシ視細胞外節膜ラフト様膜分画の脂質組成

○義山 航¹、劉 涵¹、林 文夫² (1 神戸大院 自然科学、² 神戸大 理 生物)

<目的>ウシ視細胞桿体外節(ROS)膜からTriton X-100難溶性の膜分画(ラフト様膜分画)が得られる。この分画にはトランスデューシン及びPDEが活性状態に応じて集積したり排除されたりする。G蛋白質信号系の活性化や不活性化のプロセスにこうした脂質相への移行が重要な意味を持っていることが示唆される。本発表では、ROSラフト様膜領域の特徴を明らかにするため、ラフト様膜分画およびTriton X-100可溶性膜分画の脂質組成を比較検討した。<方法>ウシ視細胞外節を1% Triton X-100(リン脂質/界面活性剤=0.5)で可溶化し、ショ糖を加えてからショ糖密度勾配遠心にかけ、比重1.10付近に分布する膜分画とシラフト様(Triton X-100難溶性)膜分画を調製した。Tritonを含む高比重の分画を可溶化分画とした。スフィンゴ脂質、リン脂質は改変Bligh-Dyer法で抽出し、高性能薄層クロマトで分離した。ヨウ素発色、リン定量、レゾルシノール発色などで各種脂質を定量した。<結果>一般的なラフトの主成分とみなされているスフィンゴ脂質(スフィンゴミエリン、ガングリオシド)はTriton X-100可溶性分画には分布せず、ほぼROSラフト様膜分画に選択的に分布していた。しかし、ラフト様膜分画にはホスファチジルエタノールアミン(PE)やホスファチジルコリン(PC)などのグリセロ脂質も大量に存在していた。ラフト様と可溶性分画を比較するとPEと高度不飽和脂肪酸を有するPCは相対的に前者に多かった。<考察>視細胞光受容膜上のラフト様膜分画の脂質組成は、一般的に細胞膜に見られるラフト膜とはかなり違い、PE及び高度飽和脂肪酸を2本もつPCがコレステロールとともにTriton X-100に比較的難溶性な脂質相を形成しているものと考えられる。

W.Yoshiyama,H.Liu and F.Hayashi : Lipid composition of raft-like membranes in bovine rod photoreceptor outer segments