1P233

桿体視細胞のロドプシンを緑錐体視物質に置換したノックインマウスの解析

○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・院生命、³CREST・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性蛋白質の性質の違いに起因すると考えられている。我々は光情報伝達の最上流に位置する視物質の性質の違いが視細胞に果たす生理的意義を調べる為に、桿体視細胞で発現する視物質（ロドプシン）を緑錐体視物質に置換したノックインマウスを作製し、視細胞応答を解析している。前回の年会では、マウス緑錐体視物質の発現による桿体視細胞の光感度の変化について報告した。マウス緑錐体視物質は、錐体視物質のサブグループの中では、ロドプシンと最も遠縁なLグループに属している。錐体視物質の果たす生理機能をより包括的に議論するため、今回新たに、ロドプシンに最も近縁なM2グループに属するニワトリ緑錐体視物質遺伝子を導入したノックインマウスを作製した。免疫組織染色の結果、マウス緑と同様にニワトリ緑は桿体外節に局在していることが分かった。分光学的に視物質の発現量を定量したところ、ロドプシンに対してマウス緑は1/10であったが、ニワトリ緑が1/5であった。一方、電気生理学的手法によって計測した視細胞の光感度は、視物質の発現量の差以上に低下し、マウス緑を発現する視細胞で野生型の1/25、ニワトリ緑を発現する視細胞で1/8の光感度に低下した。これらの結果は、桿体視細胞に異所的に発現した二種類の錐体視物質が桿体の光情報伝達効率にそれぞれ特異的な影響を与えていることを示唆している。

K.Sakurai, H.Imai, A.Onishi, O.Chisaka and Y.Shichida : Analysis of molecular and physiological properties of visual pigments using cone pigment knock-in mice

1P235

長波長感受性錐体視物質における塩素イオンの結合と解離

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

色覚に関与する錐体視物質のうち、長波長感受性(L)視物質は塩素イオン結合サイトを持ち、そのサイトに塩素イオンが結合すると長波長の光を受容できる。我々はこの結合が光反応中間体の挙動にも影響を与えるのではないかと推定し、ニワトリ赤視物質(iodopsin)を実験試料として-20℃での低温分光学的研究を行った[1]。その結果、メタI中間体からメタII中間体への変化過程で、蛋白質部分から塩素イオンが遊離するという示唆を得た。しかし、その当時は変異体の作製による直接の証明も難しく、また、低温条件によるartifactの可能性も考えられた。最近我々はiodopsinと同じグループに属するサルの緑視物質の発現および変異体作製に成功し[2]、さらに、視物質の解析に特化した高速分光光度計を開発した[3]。そこで、本研究ではこれらの手法を用い、生理条件により近い条件で検討を行った。

実験には、野性型と塩素イオン結合サイトを構成しているHis197をAlaに置換した変異体(H197A)をHEK293T細胞で発現・精製した試料を用いた。野性型、H197A変異体の吸収極大波長はそれぞれ530nmと505nmにあり、変異導入により塩素イオンの結合による長波長シフトが阻害された。これらの試料を2℃で光照射し、生成する光反応中間体のスペクトルの性質と反応速度について検討した結果、野生型と変異体では同じスペクトルの性質を示すメタI中間体が生成することがわかった。従って、メタI中間体の生成時には既に塩素イオンが蛋白質から解離している可能性が高い。今後、変異導入や塩素イオン濃度の変化による中間体の反応速度や平衡状態の変化についてに検討し、L視物質に対する塩素イオンの結合・解離機構について議論する。[1]Tachibanaki et al.(1995) Biochemistry 34, 13170 [2]Onishi et al.(1999) Nature 402, 139 [3]Morizumi et al.(2004) J. Biochem. 134, 259

T.Morizumi, S.Kuwayama, A.Onishi, H.Imai and Y.Shichida : Binding and dissociation of chloride ion on group L photoreceptor.

1P234

ノックインマウス視細胞外節膜におけるロドプシンのメタ中間体の崩壊とオプシンの生成過程

○今井 啓雄^{1,2}、桑山 成樹^{1,2}、大西 暁士^{1,2}、森住 威文^{1,2}、千坂 修³、七田 芳則^{1,2}（¹京大・院理、²CREST、JST、³京大・院生命）

ロドプシンの光反応はタンパク質部分オプシンに結合したレチナールの異性化に始まり、ミリ秒～分の時間領域でメタ中間体(I, II, III)の平衡混合物が生成する。その後、この平衡混合物からレチナールと解離したオプシンが生成する。平衡混合物にはGタンパク質を活性化する中間体が含まれているため、その挙動は光反応状態の終結と暗状態への回復を考察する上で重要である。そこで生理的条件すなわち視細胞外節膜における平衡混合物の反応動力学的解析を、メタ中間体の崩壊過程と遊離オプシンの生成過程をモニターすることにより行った。我々は遺伝子改変（ノックイン）により生体内条件における変異タンパク質の解析が可能なマウス視細胞外節を試料に研究を進めている。時間分解吸収分光法により解析した結果、野生型マウス視細胞外節膜ではメタII→メタIII遷移が時定数100秒で観測され、その後メタIIIの崩壊が時定数1000秒の単一指数関数成分として観測された。時間分解蛍光分光法によりオプシンの生成過程をモニターした結果、オプシンの生成過程はメタII、メタIIIそれぞれの崩壊と共に起こる二成分反応として観測された。一方、反応の速い錐体光受容タンパク質型に置換した変異ロドプシン(E122Q)を含む視細胞外節膜では、メタII→メタIII遷移が時定数8秒、メタIIIの崩壊が時定数500秒の指数関数成分として観測された。オプシンの生成過程は野生型の場合と同様にメタII、メタIIIそれぞれの崩壊と共に起こる二成分反応であったが、その割合は野生型の場合と異なっていた。変異体ではオプシンの生成はメタIIの崩壊と共に起こる成分の方が多く、この傾向は錐体光受容タンパク質におけるオプシン生成過程に類似していた。

H.Imai, S.Kuwayama, A.Onishi, T.Morizumi, O.Chisaka and Y.Shichida : Formation of opsin and decay of meta-intermediates of rhodopsin in the rod outer segment membrane of knock-in mice.

1P236

視細胞円板膜におけるロドプシンのブラウン運動

○林 文夫（神戸大・理・生物学科）

【目的】脊椎動物視細胞の桿体外節内には数百層の光受容膜（円板膜）が積層されている。これまで、ロドプシンは円板膜上に自由に動き回り、G蛋白質を次々に活性化すると考えられてきたが、その実際の運動を見た者はない。そこで、カエル桿体外節円板膜上のロドプシンを蛍光標識し全反射顕微鏡による一分子観察を試みた。【方法】カエル桿体外節を擬細胞内液中で破断し、そこにAbs:700nm近傍の蛍光色素で標識した抗ロドプシン抗体（C末端をエピトープとするモノクローン抗体）およびそのFab'断片を添加した。全反射顕微鏡観察は無酸素状態の擬細胞内液中で700nm近傍の赤色レーザー励起によって行った。【結果】IgGおよびFab'断片のいずれでも円板膜上を蛍光輝点がランダムに運動しているのが確認でき、細胞膜上にはほとんど認められなかった。0.5sec以内の軌跡から求められる平均二乗変位vs時間のグラフはほぼ直線にのり、ロドプシンがブラウン運動を行っていることが示唆された。Fab'断片を使って観察した1分子のロドプシンの側方拡散係数は平均0.1μm²/secで、30年ほど前に蛍光退色回復実験などから推定されている0.3μm²/secより低い値であったが、一般の膜貫通蛋白質のそれに較べてかなり速い拡散を行っていることが分かった。これに対し、2個のロドプシンと結合すると予想されるIgGを使った実験では平均側方拡散係数は0.04μm²/secと顕著に低い値が得られ、多量体形成がロドプシンの拡散速度を低下させることが強く示唆された。【総括】ロドプシンの円板膜上での濃度は2～30,000個/μm²と極めて高く、ロドプシンの断面積の総和は円板膜全体の約30%を占めると考えられる。このような高密度なロドプシンが円板膜上でのロドプシン自身の運動を制限し、多量体化が拡散係数に大きな影響を及ぼす特殊な環境を作っているものと推定される。

F. Hayashi : Brownian motion of rhodopsin on rod photoreceptor disc membranes