視細胞における順応調節蛋白質

慶応義塾大学医学部生理学教室 河村 悟

Photoreceptors adapt to light intensities over the range of 6-7 log units and cover extremely wide range of light intensities : usual chemical reactions, for example a Michaelis-Menten-type enzyme reaction, saturate over the range of -3 log units of substrate concentration. Photoreceptor cytoplasmic calcium concentration decreases during light-adaptation and this calcium decrease is at least one of the underlying mechanisms of light-adaptation. Recently researchers found novel proteins that regulate the metabolism of cGMP, the second messenger in the photo-transduction mechanism. By taking these proteins into consideration, one can explain molecular mechanism of photoreceptor light-adaptation.

light-adaptation/calcium/phototransduction/S-modulin/recoverin

はじめに

目の順応現象は誰にでも比較的馴染みのある現象であり、現象に関する限り、多くの説明を要しないであろう。例えば暗い部屋から一気に強い日差しの戸外に出た時、初めはまぶしくて目を開けていられなくてもそのうちにそうも感じなくなったり、また、夜部屋の明かりを消した直後は何も見えないのにしばらくすると薄暗がりの中で物の形が判るようになる。

われわれの光を受け取る仕組みは目の網膜内の視細胞に備わっている。強い日差しのもとでも目を機能させるために生物がとっている方法はいくつかある。その1つとして視細胞自身が強い光強度に順応し、視感度を強い光強度のもとへ移し得る能力を獲得している。

ある一定の光環境条件（例えば暗順応状態）では視細胞はほぼ 10^3 の範囲の強度の光に反応する。視細胞が明順応すると視感度が高光強度側へ移動し、その移動巾は 10^{3-4} の範囲と言われている。従って、視細胞は 10^{6-7} の範囲の光強度で機能することができる。細胞機能がこのような広い強度領域で発揮されるのは驚くべきことである。例えば、写真フィルムは 10^3 の範

囲の光強度にしか応じないし、ミカエリス-メンテン型の酵素反応でも 10^3 の範囲の濃度の基質しか区別できない。

最近、視細胞の順応に関与すると考えられる Ca^{2+} 依存性蛋白質の発見が相次いでいる¹⁾⁻⁴⁾。これら蛋白質の存在を考慮すると順応現象をある程度分子レベルで説明することができるようになった。本稿ではこれらの最近の研究成果を紹介する。

視細胞電位発現機構

視細胞では光受容の結果、視細胞電位と呼ばれる電気信号を発生する。電気生理学的には視細胞電位のレベルで順応が観察されるので、明・暗順応は、この電位発現機構を調節することによって行われると考えるのが自然であろう。そこでまず、視細胞における電位の発現機構を簡単に述べる。

視細胞には桿体と錐体の二種類が存在する。桿体と錐体とでは桿体の方が光に対する感受性が 10^3 程度低いことのほか、光を受け取る仕組みの大略と、順応による視感度の移動巾は桿体とほぼ同じである。研究は、桿体についての研究が進んでいるので、以下では桿体視細胞（図1A）について述べる。

桿体外節内には円板膜が存在し、この円板膜上に視細胞電位を発生させるための蛋白分子のほとんどが存在している。すなわち、視物質、GTP結合蛋白質であるトランスデュシン、そしてcGMP分解酵素であるホスホジエステラーゼ（PDE）などである。

Regulatory Proteins for Adaptation in Photoreceptors

Satoru KAWAMURA

Department of Physiology, Keio University School of Medicine.

図1. 桿体視細胞の模式図(A)と視細胞電位発生機構(B). 詳細は本文参照.

視細胞電位の発生する仕組みは十数年の論争の後、数年前に確定された(図1B参照)⁵⁾. 視細胞の外節の原形質膜にはcGMPが結合することにより開かれるイオンチャンネルが存在する⁶⁾. このチャンネルは K^+ , Na^+ , Ca^{2+} などの陽イオンを通すことができる^{7),8)}. 暗時のcGMP濃度は比較的高く($10\mu M$ 程度)このチャンネルは開いており、陽イオンが常時視細胞内に流入している。視物質(Rh)が光を吸収すると、吸収した光のエネルギーを利用して分子内構造変化を生じ、活性型(Rh^*)になる。活性型視物質は不活性型トランスデューシン(T_{GDP})に結合し、この蛋白上のGDPをGTPと置換する(T_{GTP})。この反応は酵素反応的に行なわれ、1分子の活性型視物質により数百分子の T_{GTP} が生成される。 T_{GTP} は活性型であるのでこの段階で光受容シグナルは大きく増幅される。 T_{GTP} はcGMP分解酵素であるホスホジエステラーゼ(PDE)を活性化するので視細胞内のcGMPが分解され、その濃度は減少する。その結果、イオンチャンネルからcGMPが外れるのでチャンネルは閉じ、陽イオンの流入が止まる。従って、明時の視細胞内の電位は暗時に比べてよりマイナスになる。視細胞電位はこのような機構によって発生する。

視細胞の明順応機構

外節の原形質膜中のcGMPチャンネルを流れる電流は電気生理学的な手法を使えば測定することが出来る。われわれは図2Aに示した標本を用いている。食用ガエルの桿体外節部分を電極内に吸引し、吸引された部分の原形質膜を横切って流れる電流を測定する。

図2. 桿体外節の原形質膜を流れる電流の測定方法(A)と、その電流に対する光の効果(B).

(A)桿体視細胞の外節部分をガラス電極内に吸引する。(B)(A)の標本に、暗順応時単発のフラッシュ光を与えた時(a)、繰り返し与えた時(b)、その後再度暗順応させた時(c)得られた電流変化。

この標本にフラッシュ光を照射すると図2Baに示されているような電流の記録を得ることができる。図では下向きが細胞にとって内向きの電流を示している。すなわち、この記録からも暗時の電流は内向きに流れており、フラッシュ光照射によってこの電流が止まることが判る。

同じ標本で今度は同じ強度のフラッシュ光を繰り返して照射すると、図2Bbに示されているように、①光応答の振幅が徐々に小さくなり、また、②応答がより短時間で終了するようになる。この2つの現象が明順応した視細胞の特徴である。応答の振幅が小さくなくても最大の応答振幅は変わらないので、①の応答振幅の減少は光に対する感度の減少に対応する。また、②の時間経過の促進は時間分解能の上昇に対応する。開いたcGMPチャンネルを流れる電流が測定されているので、電流の時間変化は視細胞内のcGMP濃度の時間変化を反映していると考えられる。すなわち、暗順応時(図2Ba)と明順応時(b)とではフラッシュ光照射後のcGMPの濃度減少の度合いと時間経過が異なっていることが予想される。

明順応に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下

外節のcGMPチャンネルが陽イオンを通すことは既に述べた。それぞれの陽イオンに対する透過性は、 $Na^+ : K^+ : Mg^{2+} : Ca^{2+} = 1 : 0.7 : 2.5 : 12.5$ である⁸⁾. 体液中では Na^+ 濃度がいちばん高いため、視細胞に流れ込む電流の約80%は Na^+ によって運ばれるがその高い透過性のために約15%は Ca^{2+} によって運ばれる。すなわちcGMPチャンネルが開いていると Ca^{2+} は視細胞内に流入する。この流入した Ca^{2+} は外節に存在する、 $Na^+ - K^+ - Ca^{2+}$ 交換ポンプにより、細胞外へ排出される(図1B参照)。

暗時の視細胞内 Ca^{2+} 濃度は、開いているcGMP

チャンネルを通して流入する Ca^{2+} 量と交換ポンプによって排出される Ca^{2+} 量とがちょうど釣りあう濃度にある。明時には細胞内 cGMP 濃度が低下してチャンネルが閉じてしまうことから Ca^{2+} の流入はなくなる。一方、交換ポンプは光条件に関係なく働いているので排出が勝り、視細胞内 Ca^{2+} 濃度は低下する。フラ-2を用いた測定によると、暗時の視細胞内 Ca^{2+} 濃度は約300nMで、明時にはそれが140nMに低下する⁹⁾。

この Ca^{2+} 濃度の低下が cGMP の合成や分解に影響を与え、明順応の1つの機構として働いていることは充分考えられる。事実、電気生理学的な実験によると、視細胞内の Ca^{2+} 濃度が低下しないような条件では明順応が生じない^{10), 11)}。では Ca^{2+} はどのようにして cGMP の制御に関わっているのだろうか？

Ca^{2+} 濃度低下による cGMP 濃度の回復の促進

われわれは電気生理学的手法を用いて cGMP の合成酵素グアニレートシクラーゼ (GCase) が低 Ca^{2+} 濃度で活性化されることを見いだした¹²⁾。用いた標本は、inside-out 視細胞外節 (I/O ROS) と呼んでいる。図2Aに示された標本から出発し、電極外の部分を細いガラス棒で折りとる。この標本では断端を通して細胞内を任意の灌流液で灌流することができるだけでなく円板膜がそのまま保持されているので cGMP 分解のための装置はほとんどすべて揃っている。従って灌流液に cGMP を加えると拡散によって cGMP が視細胞内へ入ってゆき cGMP チャンネルを開け原形質膜を横切る電流が流れる。この電流の大きさを測ると細胞内 cGMP 濃度を推定することができる。この標本はこれまで生化学的な研究で用いられてきたどの標本よりも生体内に近い条件にあるのが最大の特徴である。

このような標本に cGMP の前駆体である GTP を灌流投与してみた。すると、cGMP は加えていないのに電流が流れはじめ、しかもこの電流はフラッシュ光照射により停止した。種々の実験からこの電流は GTP から cGMP が合成された結果であることが結論された。灌流液の Ca^{2+} 濃度を下げると電流が大きくなった。すなわち低 Ca^{2+} 濃度で GCase が活性化されたため多くの cGMP が合成されたと解釈できた。この実験では10nM-1 μM の Ca^{2+} 濃度範囲で GCase 活性の変化を検出できた。

Koch と Stryer¹³⁾ も生化学的な測定から、GCase は Ca^{2+} 濃度の低下 (200nM から50nM への低下) に

伴って活性が5-20倍上昇することを報告した GCase が Ca^{2+} による制御を受けるにはある種の因子 (リカバリン; 後述) が必要である。

以上の結果から、生理的な濃度範囲での Ca^{2+} 濃度の低下により、GCase が活性化されることが明らかになった。したがって、光照射が続き、視細胞内の Ca^{2+} 濃度が低下すると cGMP の供給が盛んになり、光照射後の cGMP 濃度の回復が促進される。従って、明順応時の光応答のすばやい戻りをうまく説明できる。

Ca^{2+} による cGMP 分解の促進

視細胞のホスホジエステラーゼ (PDE) 活性は非常に高い。従ってこの酵素も同様に Ca^{2+} によって制御されれば効率よく視細胞電位を制御することができる。約十年前、われわれが比較的インタクトに近い円板膜標本を使って実験したところ、低 Ca^{2+} では cGMP 分解の効率 (PDE の光活性化の効率) が低下した。しかし、効果のあった Ca^{2+} 濃度は mM レベルであり、生理的に意味のある現象かどうかは結論できなかった。その後の追試でも明確な結論が得られず、cGMP の分解 (PDE の光依存的な活性化) に Ca^{2+} は影響しないというのが大勢であった。しかし、最近のわれわれの研究によって生理的条件の Ca^{2+} 濃度で PDE が Ca^{2+} によって活性調節を受けることが明らかになった¹⁾。

実験に用いたのは I/O ROS である。この標本に cGMP を投与すると殆ど時間の遅れ無しに電流が流れ始めた (図3)。このことは、cGMP の I/O ROS 内への拡散は早いことを意味している。次いでこれに光刺激する (矢頭) と cGMP が分解され、電流は停止した。しばらくすると電流が再び流れ始めたことから、PDE が不活性化され、cGMP が新たに外液から外節内に流入したことが判る。上で述べたように、cGMP の I/O ROS 内への拡散は早いことから、図3で記録されている光応答の波形は PDE の活性化とそれに引き続く不活性化の時間経過を反映していると解釈できる。

図3. Inside-out rod outer segment (I/O ROS; 本文参照) で観察された PDE に対する Ca^{2+} の作用。

1 mM cGMP 存在下 1 μM Ca^{2+} (a, c) および 30 nM Ca^{2+} (b) でフラッシュ光を照射した。文献1) より改変。

このような測定を異なる Ca^{2+} 濃度で行なってみたのが図 3a ($1 \mu\text{M}$), b (30nM) に示されている。PDE の光感受性は高 Ca^{2+} 濃度下 ($1 \mu\text{M}$) では高く、低濃度下 (30nM) では低いこと、また、不活性化は高 Ca^{2+} 濃度下 ($1 \mu\text{M}$) では遅く、低濃度下 (30nM) では早いことが判る。用いた Ca^{2+} 濃度は生理的な濃度範囲と言えることから、生体内では cGMP の分解 (PDE) は Ca^{2+} の影響を受けることが明白となった。

それではこれまでなぜ PDE に対する Ca^{2+} の効果が観察されなかったのであろうか？それは恐らく Ca^{2+} の作用が発揮されるには Ca^{2+} 依存性水溶性蛋白質 (S モジューリン) の存在が必要であり、これまでの研究で用いられた標本では、ほとんどの場合この蛋白質が失われていたためであると思われる。

Ca^{2+} 依存性水溶性蛋白質の存在

図 3 では I/O ROS では PDE に対する Ca^{2+} の効果が観察された。しかしこの Ca^{2+} の効果は不可逆的であり、 Ca^{2+} 濃度をもとの $1 \mu\text{M}$ に戻しても PDE の時間経過は遅くはならなかった (図 3c)。では Ca^{2+} 濃度を低下させると何が起きているのだろうか？われわれは次のような蛋白質の存在を考えた。すなわち、高 Ca^{2+} 濃度では円板膜に結合し PDE に作用するが、低 Ca^{2+} では細胞質に溶け出ししまうため作用を及ぼさなくなる蛋白質である。I/O ROS 標本では外節の細胞質側は常に灌流されているため、いったん細胞質に溶け出した蛋白質は洗い流されてしまい不可逆的な変化になると考えた。

この仮説を検証するため、低 Ca^{2+} 濃度下で外節を破碎し、水溶性蛋白質を得、これを不可逆的な変化が生じている I/O ROS に投与してみた。その結果、効果はそれほど顕著ではない (たぶん濃度が低いためと思われる) もの、 Ca^{2+} に対する感受性は確かに回復した。従って、上記の可能性が高いことが強く示唆された。

S モジューリンの精製

網膜において上記の性質を有するような蛋白質はこれまで報告されていない。そこで上記の活性を持つ蛋白質の精製を試みた。精製では、①高 Ca^{2+} 濃度で円板膜に結合し、低 Ca^{2+} 濃度で膜から遊離する、②PDE を Ca^{2+} 依存的に制御する、この 2 点を満足する蛋白質を検索した。まずカエル桿体を集め、高 Ca^{2+} 溶液で円板膜を洗った場合と低 Ca^{2+} 溶液で洗った場合とで比較し、低 Ca^{2+} で洗った時により多く抽出される

蛋白質が存在するかどうか検討した。その結果、見かけの分子量が 2 万 6 千である蛋白質 (26K 蛋白) は低 Ca^{2+} でより多く抽出された。従ってこの蛋白質は候補の 1 つであると考えた。

ついでカラムクロマトグラフィーによって蛋白質を分画し、どの画分に活性が存在するかを検討した。ゲルろ過と陰イオン交換樹脂を用いて分画したところ、PDE を Ca^{2+} 依存的に制御する活性を有する画分が存在し、かつ、その画分に 26K 蛋白が存在しており、画分ごとの活性の大きさと、26K 蛋白量がほぼ対応していた。従ってここまでの実験結果から、26K 蛋白が候補としてきわめて有力であることが判った。しかし最終的に結論するためには精製した後改めて活性を確認する必要がある。

最終的にこの蛋白質を精製するには、 Ca^{2+} 依存的に円板膜に結合する性質を利用した。すなわち、円板膜の調製を高 Ca^{2+} 濃度で行った。この条件下では 26K 蛋白は円板膜に結合していると考えられる。既に高 Ca^{2+} 溶液で円板膜を十分洗っているで殆どの水溶性蛋白質は除かれている。その後円板膜を低 Ca^{2+} 溶液で洗うことにより、選択的に 26K 蛋白を抽出することができた。ついで陰イオン交換樹脂に通し、最後に高速液クロのゲルろ過で精製することができた (図 4 A)。

図 4. 精製された S モジューリン (A) と PDE に対する作用 (B)。文献 1 より改変。

(A) 精製した S モジューリンの SDS ポリアクリルアミドゲルの銀染色像。約 $0.3 \mu\text{g}$ の S モジューリンを泳動した。

(B) 示されているそれぞれの記録の直前に、cGMP, ATP, GTP を加え、cGMP の分解にともなう pH 減少を記録した。矢印の時点で微弱なフラッシュ光 (視物質が 0.003% 退色する光量)、また、矢頭の時点で強い定常光 (毎秒 1.4% の退色) を与えた。記録 1: 30nM Ca^{2+} , -S モジューリン; 記録 2: $1 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , -S モジューリン; 記録 3: 30nM Ca^{2+} , +S モジューリン; 記録 4: $1 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , +S モジューリン。

S モジュリンの機能

もともと外節中の26k 蛋白量は視物質（ロドプシン）の1/100程度しか無くまた上記の方法では収量が10%程度であるので大量の26k 蛋白質が必要なI/O ROSでの実験は困難であった。そこで精製された26k 蛋白の活性は生化学的にPDE 活性を測定することにより確かめた。測定はpH 電極法によった。すなわち、cGMP が分解されると一分子の H^+ が溶液中に放出される。従って溶液のpH 減少を測定すればcGMP の分解量、つまりPDE 活性を測定することが出来る。

充分洗って26k 蛋白を除いた円板膜試料にcGMP を加え、低 Ca^{2+} 濃度（図4B 記録1）と高 Ca^{2+} 濃度（記録2）とで微弱なフラッシュ光（矢印）を当てた。するとcGMP の分解が盛んになりpH の低下が少し急峻になる。しかし両者の記録がほとんど同じ経過を示すことから26k 蛋白が無い場合、PDE の光依存的な活性化に Ca^{2+} は影響を与えないことが判る。一方、精製した26k 蛋白を加えると、低 Ca^{2+} 濃度の場合（記録3）は26k 蛋白を加えない場合（記録1と2）と大差ないが、高 Ca^{2+} 濃度の場合（記録4）ではpH 減少の傾きが明らかに急峻であり、PDE の活性化の程度が大きいたことが判る。非常に強い光刺激を与えた場合（矢頭）に測定されるPDE の最大活性は何れの記録でもほぼ同じであることから26k 蛋白はPDE の光感受性を増加させると言うことが出来る。このことから26k 蛋白をSensitivity modulating protein (S-modulin) と命名した¹⁾。

暗順応した視細胞の細胞内の Ca^{2+} 濃度は比較的高い（300nM 程度）。このときSモジュリンは円板膜に結合しており、光があたるとPDE の光依存的な活性化の効率を高め視細胞の光感受性を高めると同時に、視細胞電位を長く持続させると考えられる。明順応すると Ca^{2+} 濃度は140nM 程度に減少し、Sモジュリンは円板膜から遊離する。その結果、PDE の、即ち視細胞の光感受性は減少し、視細胞電位も短時間のうちに停止することになる。

以上のように、明順応にともなう細胞内 Ca^{2+} 濃度の減少によって引き起こされる、①GCase の活性化と、②Sモジュリンの円板膜からの遊離、により明順応に伴う視細胞の光感受性の減少と視細胞電位の持続時間の減少のかかなりの部分を説明することが出来るようになった。

リカバリン

われわれがカエルのSモジュリンの存在を報告してちょうど1ヶ月後、Stryer らが低 Ca^{2+} 濃度下でGCase を活性化する因子をウシ網膜から精製したことを報告した²⁾。明順応時、cGMP 合成を促進して視細胞電位の回復（recovery）を速やかにすると考えられるのでリカバリン（recoverin）と命名された。リカバリンの見かけの分子量は2万6千であり、cDNA から予測されたアミノ酸の一次配列を見ると、3つのEF ハンド構造を持ち、ビジニン¹⁴⁾と60%の相同性があった。

これまで我々が調べた範囲では、Sモジュリンはリカバリンと約80%の相同性を有している。カエルとウシの違いを考えると両蛋白質が同じかどうかは直には結論できないが似ている蛋白質には間違いない。興味あることは、われわれの方法ではウシからはSモジュリン様物質が検出されないのに、カエルからはSモジュリンに加えてリカバリン様蛋白質が検出できる点である。3者の関係はこれから明らかにして行かなければならない。

おわりに

ある種のガン患者では、網膜にまではガンが転移していないのに視細胞が壊れていく。Polans ら⁴⁾は、このような患者ではリカバリンに対する抗体が異常に多く作られていることを明らかにした。網膜以外の場所でリカバリンに対して抗体が作られ、網膜にたどりついて視細胞を破壊すると考えられている。従って、リカバリン（Sモジュリン）様物質はおそらく網膜以外にも存在する可能性が高い。本稿で紹介したような研究が視覚のみにとどまらず、共通した刺激受容機構が存在する他の感覚器も含めて、細胞内情報伝達系の新しい調節機構の研究としてこれから大きく発展することを期待したい。

文 献

- 1) Kawamura, S., Murakami, M. (1991) *Nature*, 349, 420-423.
- 2) Dizhoor, A. M., Ray, S., Kumer, S., Niemi, G., Spencer, M., Brolley, D., Walsh, K. A., Philipov, P. P., Hurley, J. B., Stryer, L. (1991) *Science*, 251, 915-918.
- 3) Lambrecht, H.-G., Koch, K.-W. (1991) *EMBO J.*, 10, 793-798.
- 4) Polans, A.S., Buczylo, J., Crabb, J., Palczewsky, K. (1991) *J. Cell Biol.*, 112, 981-989.

- 5) 総説集として,「視覚の分子メカニズム」,蛋白質核
酸酵素 臨時増刊 4, 津田・前田編, 共立出版,
(1989) がある.
- 6) Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S., Lubarsky, A. L. (1985)
Nature, 313, 310-313.
- 7) Hodgkin, A. L., McNaughton, P. A. and Nunn, B. J. :
(1988) *J. Physiol.*, 358, 447-468.
- 8) Nakatani, K., Yau, K.-W. (1988) *J. Physiol.*, 395, 695-
729.
- 9) Ratto, G. M., Payne, R., Owen, W. G., Tsien, R. Y. (1988)
J. Neurosci., 8, 3240-3246.
- 10) Matthews, H. R., Murphy, R. L. W., Fain, G., Lamb, T.
D. (1988) *Nature*, 334, 67-69.
- 11) Nakatani, K., Yau, K.-W. (1988) *Nature*, 334, 69-71.
- 12) Kawamura, S., Murakami, M. (1989) *J. Gen. Physiol.*
94, 649-668.
- 13) Koch, K., Stryer, L. (1988) *Nature*, 334, 64-66.
- 14) Yamagata, K., Goto, K., Kuo, C.-H., Kondo, H., Miki, N.
(1990) *Neuron*, 2, 469-476.

かわむら さとる

昭和53年京大・大学院・生物物理学専攻を修了後, 米国ウィスコン
シン大学で約2年間ポスドクをした後, 幸いに現教室に職を得た。
元々は生化学の出身であるが現教室では電気生理学を講義している。
学生にとって電気が少しでもとっつき易いものになればと願ってい
る。

生物物理とのつきあいは約20年。当初と変わらず自由な雰囲気は
いいが, 他学会と比べると少し緊張感が足りない気がする。趣味は
テニス。研究歴よりも長い。

☎03-3353-1211 内線2615