

視細胞における光受容の高い 時間分解能を実現するメカニズム

神戸大学理学部教授

林 文 夫

視細胞における光受容の高い時間分解能を実現するメカニズム

1 研究の背景と目的

私たち高等動物の眼は極めてよく発達した情報受容器（センサー）です。闇夜では1粒の光粒子を捕らえる超高感度を発揮するかと思えば、夏の砂浜やテニスコートのように強烈な光の中でも鮮明な映像を逐次脳に送ることができます。このような眼の重要な機能は網膜上に絨毯の毛のように広がる1億個ほどの視細胞という細胞によって実現されています。これらの視細胞はそれ自身では映像を捕らえているわけではなく、視細胞からの明暗情報が網膜の反対側表面にある視神経細胞を介して脳の視覚野に情報を送っており、網膜上に写った映像を脳の中に再構成して映像を認識するわけです。視細胞は明暗情報だけを受容し、光強度に対応した量の化学伝達物質を分泌する役割を果たしています。視細胞の光受容の時間分解能は数10ヘルツですが、受容できる光強度の範囲は最低の光強度から106倍を越える強い光まで受容できます。こんなテレビカメラを作れるとしたらどのくらいの大きさになるのか専門家に聞いてみないと分かりませんが、現実の視細胞の直径は数ミクロン、長さは数10ミクロンという顕微鏡でないと見えないほど小さなものです。現代の電子工学の粋を集めてもまだかなわないような高度なメカニズムがわずか1ミリメートル立方の1000分の1という小さな空間の中で働いているわけです。

視細胞という細胞は神経細胞の一種ですが、光を吸収するための色素タンパク質を持った神経細胞です。この色素タンパク質は人間の場合4種類あり、3原色による色の識別と明暗の識別にたずさわっています。色素タンパク質が光を吸収した後、かなり複雑な増幅機構を経て細胞の内部の液相に溶けているcGMPという物質の減少を引き起こします。この物質の減少が細胞膜のイオン透過性に影響を与えて最終的な神経としての電気的な応答につながります。

視細胞の中で光信号が細胞膜電位の変化につながるまでの道筋はここ20年ほどの世界中の研究者の努力で大筋のところは明らかになっています。しかし、光刺激が終わって暗くなった時にどうやって元の状態に戻すのか、その機構についてはあまりよくわかってはいません。この機構は絶え間なく変化する外の世界の様子を脳の中に取り込む場合、なくてはならない重要な機構です。この機構の解明がこの研究の中心課題です。つまり私たち脊椎動物の視細胞にそなわった高い時間分解能をささえる分子メカニズムがどうなっているかを明らかにすることです。また、この分子機構は背景光強度に対応してセンサーとしての感度を大きく変えるメカニズム（明順応、暗順応）とも密接に関わっており、視細胞に限らず、細胞の情報受容変換機構の研究で現在の中心的課題になっています。

視細胞のうちでも明暗の識別に用いられている桿体細胞という視細胞の光情報変換分子機構を図1に示します。光はロドプシン（視紅）という紅色をしたタンパク質に吸収され、赤い色素を黄色に退色させるとともにそのタンパク質

の構造を変化させます。すると、GTP-結合タンパク質の一種であるトランスデューシン ($T_{\alpha\beta\gamma}$) と相互作用するようになります。ロドプシンと結合したトランスデューシンは構造変化して T_{α} に結合していた GDP という物質を細胞質中の GTP と交換し、ロドプシンから離れて cGMP 分解酵素 ($PDE_{\alpha\beta\gamma 2}$) のそばに近づき、その酵素を抑制している γ サブユニット (P_{γ}) を引き抜きます。それまで抑えられていた PDE は潜在的な活性を一挙に発現させて、その近くの細胞質にある cGMP という物質を分解し GMP に変えてしまいます。ロドプシンは一旦退色すると平均 500 個のトランスデューシンを活性化させ、トランスデューシンはそれぞれ一個の PDE を活性化させます。活性化された PDE は 1 秒間に 1,000 個以上の cGMP を分解するため、1 個の光量子の吸収による 1 分子のロドプシンの退色が 50 万個の cGMP を分解させるという計算になり、情報の大幅な増幅が行われます。この cGMP 濃度の減少は、視細胞の細胞膜上に分布する cGMP 依存性陽イオンチャンネルというタンパク質からできた孔を閉じさせることになり、その結果細胞膜の膜電位が何 mV か変化します。この電位変化が視細胞から次の神経細胞への化学伝達物質の分泌を変化させ、視細胞から情報が発信されるわけです。

ここまでの、超高感度を実現する視細胞の分子メカニズムですが、1 光量子で興奮させられた視細胞は何らかの方法でまた元の静けさを取り戻さなくてはなりません。そのためには、光刺激に伴って活性化された PDE を早く不活性化し、同時に分解された cGMP を補充してやらねばなりません。このための分子機構を検討しようと言うのが本研究の目的といえます。

2 研究方法・研究内容

上記のような研究目的を持って、1) PDE を不活性化する機構の一つとして、PDE 阻害サブユニットのリン酸化について、2) PDE 阻害サブユニットの ADP-リボシル化について、3) cGMP 合成酵素 (グアニレートサイクレース: GC) の Ca^{2+} による調節機構について、4) イノシトール脂質代謝変動による cGMP 代謝系の活性調節について研究を発展させました。

1) PDE 阻害サブユニット (P_{γ}) のリン酸化について

この現象は報告者自身が発見したのですが、近年、光照射後の PDE の迅速な不活性化に不可欠なものではないかと考えられつつあります。 P_{γ} をリン酸化するプロテインキナーゼを各種プロテインキナーゼの抗体を用いて検討しました。また、ゲル内リン酸化法による酵素分子量の同定や、ウシあるいはカエルの視細胞外節 (光情報変換機構の固まり) を材料にして、各種カラムクロマトグラフィーを用いた精製も試みました。

2) PDE 阻害サブユニットの ADP-リボシル化の検討

リン酸化に引き続き、 P_{γ} の翻訳後修飾を検討しました。特に ADP-リボシルトランスフェラーゼによるリボシル化の有無を調べました。

3) グアニレートサイクレースの Ca^{2+} による調節機構について

グアニレートサイクレースは報告者が世界に先駆けて精製に成功した酵素で、

視細胞内の cGMP レベル回復過程で重要な働きをする膜結合性の酵素です。この酵素の細胞内領域には酵素の触媒領域の他にプロテインキナーゼと類似の構造を持った調節領域と考えられるがあります。プロテインキナーゼ類似部分のペプチドを合成しその抗体をウサギに作らせました。この抗体をウシ視細胞外節に投与し、 Ca^{2+} 感受性のグアニレートサイクレース活性への影響を検討しました。

また、グアニレートサイクレースという酵素は視細胞の他の膜タンパク質と異なり、中性界面活性剤では可溶化されません。このことからグアニレートサイクレースは細胞骨格結合性の酵素であろうと考えられてきました。なぜ情報変換系の他の膜タンパク質と異なって細胞骨格に結合していなければならないのかは不明ですが、精製グアニレートサイクレースを用いたオーバーレイ法という方法と特異抗体を組み合わせ、視細胞外節の細胞骨格成分の中にグアニレートサイクレースと特異的に結合するタンパク質を検索しました。

4) イノシトールリン脂質代謝変動のcGMP 代謝系への影響について

イノシトールリン脂質という物質は生体膜を構成する微量リン脂質ですが、リン脂質のくせに膜を介した情報変換に重要な役割を持っていることが知られるようになっていきます。これまでの研究はこのリン脂質を分解するホスホリパーゼ C (PI-PLC) が細胞外刺激受容に伴って活性化され、分解産物がセカンドメッセンジャーとなって各種の細胞内応答を引き起こすというスキームで行われてきました。報告者も 10 数年前に脊椎動物視細胞外節内に活発なイノシトールリン脂質代謝系が存在し、光刺激で代謝変動が見られることを初めて報告しました。しかし、このイノシトールリン脂質の光依存性代謝変動は無脊椎動物の視細胞ではその重要性が指摘されてきたにも関わらず、脊椎動物視細胞ではどのような生理的意義を持っているのかが不明なままです。ウシあるいはカエルの視細胞外節を用いて、イノシトールリン脂質代謝に影響を与える薬剤の cGMP 代謝系への影響をタンパク質のリン酸化や PDE活性のリアルタイム計測法を用いて検討しました。

3 研究結果

1) PDE 阻害サブユニット (Pγ) リン酸化酵素の解明

PDE 阻害サブユニットをリン酸化するプロテインキナーゼは視細胞外節に微量にしか存在せず、300個のウシあるいはカエル眼球からは一次構造を決定できる程の量が精製できませんでした。しかし、このプロテインキナーゼの分子量と等電点がほぼ同定でき、2次元電気泳動上のスポットがクマージブルー染色で検出できるまでになりました。より回収効率を上げ、出発材料の量を倍増することで困難を解決できる可能性が生まれました。このプロテインキナーゼはこれまでの所 MAP キナーゼ、A-キナーゼ、B-キナーゼ、C-キナーゼのいずれの抗体とも結合せず、新規のプロテインキナーゼである可能性が高いと思われます。

2) PDE 阻害サブユニットは内在性のリボシルトランスフェラーゼでADP-リボシ

ル化される

視細胞外節に ADP-リボシルトランスフェラーゼが内在することを確認し、PDE の γ -サブユニットが GTP-トランスデュースイン依存的に ADP-リボシル化されることを発見しました。新しい順応機構の存在が示唆されます。

3) グアニレートサイクレーズの Ca^{2+} 依存性調節因子はサイクレーズのキナーゼ類似領域に結合する可能性が高い

Ca^{2+} -感受性 GC 活性への抗ペプチド抗体の効果を検討した結果、グアニレートサイクレーズのキナーゼ類似領域の内、一般的なプロテインキナーゼの調節領域と見られる DFG-APE ループに相当する部分の抗ペプチド抗体によって大きな阻害が起こりました。この阻害は精製酵素では認められず、 Ca^{2+} -感受性活性化因子 (GCAP あるいは p-24) による活性化を競合的に阻害している可能性が示唆されました。

また、視細胞外節の細胞骨格分画のタンパク質を SDS-ゲル電気泳動で分離し、精製グアニレートサイクレーズオーバーレイ法と特異抗体を組み合わせ、グアニレートサイクレーズ結合タンパク質を同定しました。分子量 30 kDa のタンパク質で、現在一次構造を決定しようとしています。

4) イノシトールリン脂質代謝変動は光依存性 cGMP 加水分解系に影響を与え、順応現象に関与しているかもしれない

無傷の視細胞外節標品を用いてイノシトールリン脂質代謝阻害剤の cGMP 代謝系への影響を検討した結果、視細胞外節膜内でのイノシトールリン脂質代謝変動が光依存性 cGMP 加水分解系に影響を与えることが示唆されました。現在、光依存性 cGMP 分解活性調節へのイノシトールリン脂質代謝系の関与を詳細に検討しています。

まだ多くの検討を必要とすることは明らかですが、以上の研究結果から、視細胞の光受容機構に備わっている速い時間応答特性と背景光に対する幅広い順応特性を可能にする機構として、cGMP 分解系及び合成系のどちらにも極めて巧みなフィードバック機構が存在し、そのいくつかについて全く独自に新しい知見を得つつあると考えられます。

4 生活や産業への貢献及び波及効果

本研究の結果がすぐに生活や産業に貢献するとは考えられませんが、細胞内情報変換の分子機構を解明することは、ガンを含む、細胞の未知な分子機構の変調に由来する疾患の病理や、治療法の開発に必須の知識となると信じます。

また、視細胞の光情報変換機構では、重要な機能を持ったタンパク質分子が”部品”となって極めて高度な機能を持つ”分子機械”を形成しているわけですが、このような超微細であり超省エネルギー型の高性能な分子機械がどのようなメカニズムで動いているのかがわかってくると、そうした特徴を持つ機械を設計し、産業に応用できるようになる可能性も夢だけではなくてくるものと考えます。

図 1

脊椎動物視細胞の光情報変換機構の概念図

Rh: ロドプシン (視紅)、GDP- T_α : GDP-結合型トランスデュシン、GTP-結合型トランスデュシン、PDE: cGMP-加水分解酵素、GC: グアニレートサイクレース、GCAP: グアニレートサイクレース活性化因子

