

Title	桿体と錐体における視物質リン酸化とその制御機構
Author(s)	有信, 大輔
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/1085">http://hdl.handle.net/11094/1085</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	ありのぶ たいすけ 輔
博士の専攻分野の名称	博士 (生命機能学)
学位記番号	第 23936 号
学位授与年月日	平成 22 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学位論文名	桿体と錐体における視物質リン酸化とその制御機構
論文審査委員	(主査) 教授 河村 悟 (副査) 教授 小倉 明彦 教授 倉光 成紀

## 論文内容の要旨

脊椎動物の網膜には、桿体と錐体の2種類の視細胞が存在する。どちらも光刺激を電気応答に変換する働きをもつ。しかし、桿体と錐体は光に対する感度が異なる。桿体は感度が高いため暗所で働き、錐体は感度が低いため明所で働く。また、桿体と錐体では電気応答の時間経過が異なり、桿体では応答時間が長く、錐体では短い。

視細胞において、光刺激を電気応答に変換する機構（光情報伝達機構）に関わる蛋白質は、桿体と錐体で相同である。それに関わらず、光に対する感度や応答の時間経過が異なるのは、光情報伝達機構での酵素反応の効率が異なるためであることが、これまでに示唆されている。現在までに、桿体と錐体とでいくつかの反応の効率が実際に異なることが解っているが、私はその中で、リン酸化による視物質の不活性化反応の違いに着目した。光で活性化された視物質がリン酸化によって不活性化される反応は、錐体の方がはるかに速い。この反応は非常に速く、これまでの報告では正確にその速度を測定できていなかった。そこで本研究では、高い時間分解能で正確に、任意の時間で反応を止めることができる装置を用い、桿体と錐体で視物質がリン酸化される速度がどの程度異なっているかを定量的に調べた。その結果、錐体視物質のリン酸化の方が50倍ほど速いことがわかった。これにより、桿体と錐体での応答時間の違いをもたらす分子メカニズムの一端が明らかになった。

ところで桿体では、光刺激が強くなると電気応答が速やかに飽和していくのに対し、錐体ではなかなか飽和しない。その理由として、錐体では強いキナーゼ活性のため、非常に強い光刺激により大量の視物質が活性化されても、そのほとんどが瞬時にリン酸化され不活性化されるのに対し、桿体ではリン酸化されない活性型の視物質が残存するとの可能性が考えられた。そこで、様々な光刺激強度でどれだけの視物質がリン酸化されるかを、桿体と錐体で測定した。その結果、桿体では弱い光でリン酸化がすぐに飽和するのに対し、錐体では光を強くしても、すなわち大量の活性型の視物質が存在しても、リン酸化が十分に生じることが解った。このことから、錐体での強いキナーゼ活性によって、錐体での応答の早い終息を説明できるだけではなく、錐体で電気応答が飽和しにくい現象をも上手く説明できる。

錐体の高いキナーゼ活性は、桿体視物質キナーゼ (GRK1) より錐体視物質キナーゼ (GRK7) が、高いキナーゼ活性を有しており、なおかつ10倍程度多く発現していることによる。その一方で、視物質キナーゼはCa<sup>2+</sup>依存的な活性調節を受けている。細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度は、暗時には高く、明時には低下する。視物質キナーゼはCa<sup>2+</sup>濃度が高いとき、すなわち光刺激直後には、Ca<sup>2+</sup>結合蛋白質により活性が阻害される。従って、桿体と錐体とで、視物質のリン酸化がどのように感度の違いや時間経過の違いに寄与しているかを理解するには、このCa<sup>2+</sup>依存的な

調節も含めて理解する必要がある。そこで、桿体と錐体におけるCa<sup>2+</sup>濃度依存的なリン酸化活性調節を検討した。

リン酸化活性の調節を行うCa<sup>2+</sup>結合蛋白質は、桿体ではS-modulin、錐体ではvisininである。そこでまず、外節でのS-modulin、visininの発現量を測定した。その結果、visininはS-modulinより20倍ほど豊富に存在することがわかった。次に、桿体型阻害 (S-modulinによるGRK1の活性阻害)、錐体型阻害 (visininによるGRK7の活性阻害) における、S-modulin、visinin濃度依存性、およびCa<sup>2+</sup>濃度依存性も測定した。その結果から細胞内での活性を推測すると、錐体内でのキナーゼ活性阻害は、桿体と比べ2.5倍ほど強いことがわかった。このことは、錐体でリン酸化活性調節の幅が桿体より大きいことを意味する。錐体は桿体に比べ、光感度が低いだけでなく、応答できる光刺激強度の範囲がはるかに広いことが知られている。今回の結果から推測された錐体での幅広いリン酸化活性の調節は、錐体が幅広い光強度で機能できる一因である可能性が考えられる。

桿体型阻害 (S-modulinによるGRK1の活性阻害) よりも錐体型阻害 (visininによるGRK7の活性阻害) が強い原因としては、GRK7がGRK1よりも阻害を受けやすいことに理由があることが解った。また、その理由として、S-modulinやvisininとの相互作用領域であるN末端領域は、GRK1よりもGRK7の方が、S-modulinやvisininにより高い親和性を有することによることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

網膜中の視細胞である桿体と錐体は光刺激を受けると電気的応答を発生する。電気的応答が終息するためには光によって活性化された視物質が不活性化されなければならない。

その不活性化に与るのが視物質のリン酸化反応である。錐体では電気的応答の終息が早い。そのため、視物質のリン酸化は錐体の方が桿体よりも早いであろうことが推測される。本研究では、迅速反応停止装置を使って視物質リン酸化は錐体の方が数十倍以上早く進行し、1秒以内で終了することを明らかにした。さらに、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を介してこのリン酸化が調節されて明順応が生じることが考えられているが、錐体では細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化によるリン酸化調節幅が桿体に比べて百倍以上もあることを示した。錐体の明順応できる光強度の範囲は桿体のそれと比べてはるかに広いことが知られており、今回示された結果から、錐体が広範な光強度で順応できるメカニズムの一つが明らかになった。

以上の成果は、錐体視細胞の機能メカニズムを明らかにする研究として多大の貢献を成すものと評価でき、生命機能学博士の学位に値するものと認める。