

Title	Quantitative aspects of cGMP phosphodiesterase activation in carp rods and cones
Author(s)	越谷, 祐貴
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/34048">https://doi.org/10.18910/34048</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 越谷 祐貴 )

論文題名 Quantitative aspects of cGMP phosphodiesterase activation in carp rods and cones  
(コイ桿体と錐体とでのcGMPホスホジエステラーゼの活性化効率の定量的理解)

## 論文内容の要旨

脊椎動物の網膜には、桿体と錐体の2種類の視細胞がある。桿体は錐体に比べて光に対する感度が数百倍高く、脊椎動物はこれら2種類の視細胞を使い分けることで、さまざまな光環境下でもものを見ることができる。

桿体と錐体では、光を受容し、電気的な応答に変換する仕組みは同じであると考えられている(図1)。この仕組みは、まず、視物質(R;桿体ではロドプシン)が光を受容して活性化(R\*)されることで始まる。次に、R\*は、三量体G蛋白質の一種であるトランスデュシン(Tr)を活性化し、活性化されたTr(Tr\*)は、さらにcGMPホスホジエステラーゼ(PDE)を活性化する。活性化されたPDEがcGMPを加水分解して、細胞内のcGMP濃度が減少すると、cGMP依存性陽イオンチャネルが閉じて過分極性の応答が生じる。その一方で、R\*とTr\*はそれぞれ不活性化され、cGMPはGTPから合成されて元の濃度に回復するため、閉じたcGMP依存性チャネルが再び開いて、応答が終息する。その結果、光信号はその強度に応じて電気応答に変換される。

前述のように、桿体と錐体では、光に対する感度が異なっており、その一因は、視物質が光を受容してから過分極性の膜電位変化が起こるまで(図1)のシグナル増幅効率の違いであると考えられている。桿体と錐体では、これらの酵素反応を構成する各蛋白質において、異なるサブタイプが発現しているため、蛋白質の違いが酵素反応の効率の違いに寄与している可能性がある。

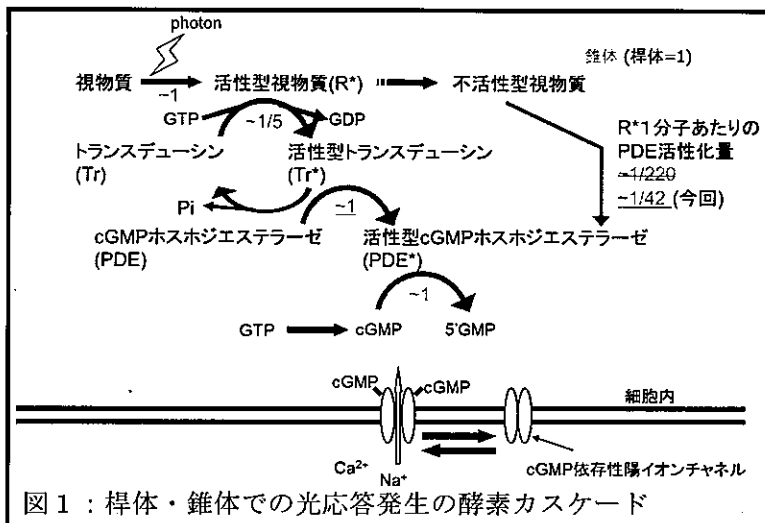
我々の研究室では、精製コイ桿体、錐体膜試料を用いて、R\*がTrを活性化する効率が錐体では桿体の約1/5であること、同量のR\*によって活性化されるPDE量が錐体では桿体の1/220であることを報告している(図1)。これらの結果から、1分子のTr\*によるPDEの活性化量は、錐体では桿体の約1/40であることが想定された。そこで私は、この違いの分子メカニズムを明らかにしたいと考えた。この40倍の違いは、Tr\*がPDEを活性化する効率と、R\*とTr\*それぞれの分子の寿命とに依存する。そこで、これらを桿体と錐体とで比較することを試みた。

まず、Tr\*がPDEを活性化する効率を桿体と錐体とで比較した。TrはGTPと結合して活性型となるが、GTPが加水分解されると、Tr\*は不活性化される。そこで、GTPのかわりに非加水分解性アナログであるGTP $\gamma$ Sを使ってPDEの活性化量を桿体と錐体とで比較した。これにより、Tr\*の寿命の違いの寄与を無視することが出来る。このとき、どれだけのTr\*が生成したかを知るために、内在性のTr量よりも少量の、正確に定量したGTP $\gamma$ Sを加え、放射性ラベルしたGTP $\gamma$ SのTrへの結合量を測定することによって、Tr\*量を決定した。その結果、桿体・錐体において、Tr\*がPDEを活性化する効率には差がないことが明らかとなった。

次に、Tr\*の寿命の違いの影響を調べた。Tr\*の寿命は、Trに結合したGTPの加水分解の速さによって決まる。この反応は、桿体に比べて錐体でより速いことがすでに明らかになっている。この不活性化反応が速いほど、つまり、Tr\*の寿命が短ければ短いほど、正味のTr\*の量が減少し、活性化されるPDEの量は減少する。言い換えると、Tr\*の不活性化が速い錐体では、桿体に比べて1分子のTr\*で活性化されるPDE量が少ないと考えた。

そこで、GTP $\gamma$ Sを添加した条件と、GTPを添加した条件で、PDEの活性化量を桿体膜・錐体膜でそれぞれ比較した。その結果、何れの膜でも、同量のR\*によって活性化されるPDE量は、Tr\*が不活性化されるGTPを添加した条件の方が少ないことが分かった。桿体ではその違いは僅かであったが、錐体では2倍ほどPDEの活性化量が低下した。このことから、1分子のTr\*によるPDEの活性化量が錐体で少ないのは、錐体では桿体よりもTr\*の寿命が短いことが一因であることが示された。なお、以前の測定では、同量のR\*によって活性化されるPDE量が錐体では桿体の1/220であると報告されていたが、今回、より厳密な実験条件で測定した結果、その数値は1/42であることが明らかになった。桿体に対する錐体でのR\*によるTrの活性化の効率の違い(1/5)とTr\*の寿命の違いによる寄与(1/2)を考慮すると、R\*の寿命の違いは、PDEの活性化効率に4(42/10)倍ほど寄与していることが推定された。なお今回の測定はATP存在下で行っており、R\*の寿命とはリン酸化されたR\*の寿命を意味する。

以上の結果から、錐体で単位Tr\*あたりのPDE活性化量が桿体よりも少ないのは、R\*がTrを活性化する効率が低いことに加えて、R\*とTr\*の寿命が短いことに原因があることが明らかになった。



## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 越 谷 祐 貴 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教 授 河 村 悟
	副 査 教 授 倉 光 成 紀
	副 査 准教授 久 富 修

## 論文審査の結果の要旨

申請者はコイ桿体と錐体での光受容シグナルの増幅度合いの違いをもたらすメカニズムについての研究を進めた。脊椎動物の視細胞である桿体と錐体において、錐体は桿体に比べて光に対する感度が低い。この違いは、視物質が光を受容してから電気的応答を発生するための仕組みである光-電位変換機構において、信号の増幅度合いが錐体で低いことに一つの理由があると考えられている。光-電位変換機構は、視物質、トランスデュースン、細胞内情報伝達物質である cGMP を分解する酵素、cGMP ホスホジエステラーゼ (PDE)、から構成され、これらがカスケードを構成し、順次活性化されることで信号の増幅が行われている。

これまでの研究で、錐体では桿体に比べて、単位光量あたりの PDE の活性化量が 42 倍低いこと、そのうちの 5 倍分は、視物質によるトランスデュースンの活性化効率が桿体に比べて錐体で 5 倍低いことで説明されていた。しかし、残る 8 倍分について、光-電位変換機構のどこにその理由があるのか明らかでなかった。そこで、申請者は、この点について調べ、まず、活性型トランスデュースンによって PDE が活性化する効率は桿体と錐体とで違いが無いことを明らかにした。次いで、これまでに、錐体での活性型視物質と活性型トランスデュースンの寿命は桿体でのそれらより短く短いことが知られていることから、これらの寿命が PDE の活性化量にどの様に影響するかを調べた。その結果、これらの寿命が短くと、単位光量あたりの PDE 活性化量が少なくなることが明らかになり、残りの 8 倍分について説明することが出来た。

以上の研究によって、桿体と錐体とでの光感度の違いを分子レベルで説明することが可能になった。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として充分価値あるものと認める。