



Title	コイ錐体視細胞で起こる新規の11-シスレチナール生成反応（AL-OL酸化還元共役反応）の解析
Author(s)	佐藤, 慎哉
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34067
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士学位論文

コイ錐体視細胞で起こる
新規の11-シスレチナール生成反応
(AL-OL酸化還元共役反応) の解析

大阪大学大学院理学研究科
細胞内情報伝達研究室 (河村研究室)

佐藤慎哉

2014年1月

目次

要約.....	1
本研究の背景.....	3
第一章 AL-OL 反応の特性解析.....	6
序論.....	6
実験方法.....	7
結果.....	13
考察.....	21
今後の見通し.....	25
第二章 AL-OL 反応の触媒酵素、コイ RDH13L の同定と機能解析.....	26
序論.....	26
実験方法.....	27
結果.....	36
考察.....	46
今後の見通し.....	49
引用文献.....	50
業績一覧.....	54
謝辞.....	55

要約

網膜中の視細胞に存在する光受容体、視物質は、タンパク質部分（オプシン）と光を受容するための分子である11-シスレチナールから構成されている。光受容後、11-シスレチナールはオールトランスレチナールへと異性化されたのち、オプシンから解離し、オールトランスレチノールへと還元されるので、光を絶えず検出するためには11-シスレチナールを新たに供給し、視物質を再生する必要がある。そのため、桿体、錐体の両視細胞には、これらに接する色素上皮層を介するレチノイドサイクル（ビジュアルサイクルとも呼ばれる）によって11-シスレチナールが供給されることが知られていた。しかし近年、錐体には、ミューラー細胞から供給される11-シスレチノールを酸化して11-シスレチナールを生成し、錐体視物質の再生を行う錐体特異的なレチノイドサイクルが存在することが明らかにされてきた。宮園ら（2008）はコイ網膜において、11-シスレチノールを酸化して11-シスレチナールを効率的に供給する反応（AL-OL反応）が錐体特異的に存在することを明らかにした。私はこれが錐体特異的なレチノイドサイクルの一部を形成し、錐体視物質の効率的な再生を可能にしていると考えている。

AL-OL反応は以下の3つの点で特徴的である。（1）11-シスレチナール生成反応の基質として、11-シスレチノールに加えてオールトランスレチナールを必要とする。（2）11-シスレチナールとオールトランスレチノールがほぼ等量生成する。（3）NADP (H) のような補酵素の添加が必要とされない。本研究では、この反応の起こる仕組みや、生体内での役割をより深く理解するために、反応が持つ特性の解析と、反応を触媒する酵素の同定、及び機能解析を行った。

AL-OL反応が持つ特性の解析は、実験材料として精製コイ錐体膜試料を用いて、生化学的な手法で行った。最初に、同反応がレチナールとレチノールの間で起こる酸化還元共役反応である事を確認した。そしてさらに、同じ実験材料を用いて反応の基質特異性、反応機構、及び細胞内局在について検討した。基質特異性解析の結果、酸化反応は11-シスレチノールと9-シスレチノールに特異的である事が分かった。その一方、還元反応は低い特異性を示し、オールトランス、9-シス、11-シス、13-シスレチナール、さらにはベンズアルデヒドさえも含む多様な構造のアルデヒドに対して反応性を示した。この結果から、本研究では反応の名称を、先行研究で用いられていたレチナール-レチノール酸化還元共役反応から、アルデヒド-アルコール酸化還元共役反応に変更した。ただし、その略称は以前と同じAL-OL反応とした。AL-OL反応の反応機構を反応速度論的な方法で解析した結果、同反応の進行には、触媒酵素、レチノール、アルデヒドから成る3者複合体の形成が必要であることが示唆された。この結果から、触媒酵素はレチノールとアルデヒドそれぞれに対して別々の結合部位を持つことが予想される。AL-OL反応の細胞内局在解析の結果からは、反応活性が錐体の内節部分の膜に局在し、視物質とは共局在しないことが示された。

本研究で得られたAL-OL反応が持つ特性に関するこれらの知見から、AL-OL反応は先行研究で予想された通り、錐体視物質の再生に寄与する反応であることが支持された。しかし、その仕組みはレチナールの細胞内移動やレチナール以外のアルデヒドが関与する、予想以上に複雑なものであることが示唆された。

AL-OL反応を触媒する酵素の同定は、精製コイ錐体膜試料からAL-OL反応活性を示すタンパク質を部分精製し、試料中の一部のタンパク質を同定する事で行った。その結果、触媒酵

素の有力な候補としてコイのレチノール脱水素酵素13様タンパク質（コイRDH13L）が同定された。そこで、コイRDH13LがAL-OL反応触媒酵素であることを確認するために、C末端にHis6タグを融合したコイRDH13L（コイRDH13L-His6）を昆虫培養細胞Sf9に発現させ、精製し、そのAL-OL反応活性を測定したところ、活性が検出された。活性は、タグを融合していないコイRDH13Lを発現させたSf9の膜試料からも検出された。AL-OL反応活性はコイRDH13Lを発現させたSf9の膜試料からも検出され、コイRDH8、および、RDH8L2を発現するものからは検出されなかった。コイRDH13Lがコイ錐体で起こるAL-OL反応を担う分子かどうかを検討するために、コイRDH13Lと精製コイ錐体のAL-OL反応の性質を比較した。その結果、RDH13Lは錐体のAL-OL反応活性と同様に錐体内節に局在していた。しかし、発現RDH13Lの比活性とコイ錐体に存在するRDH13L量をもとに推定した、錐体中のRDH13Lが持つAL-OL反応活性は、コイ錐体の全AL-OL反応活性の5分の1程度で、また、コイRDH13Lの基質特異性はコイ錐体のものと少し違っていた。このことから、コイRDH13Lは錐体で起こるAL-OL反応の一部を担うが、その全てを担う酵素ではないと予想している。また、AL-OL反応においてNADP(H)の関与が想定されたので、精製コイRDH13L-His6に含まれるNADP(H)を定量した結果、分析に用いたRDH13L量の44 ± 7%に相当する量のNADP(H)が検出され、そのほとんどは酸化型のNADP⁺であった。

本研究ではコイRDH13Lの機能解析に加えて、AL-OL反応が哺乳動物でも存在するのか、ということも検討した。コイRDH13Lと似たアミノ酸配列を持つマウスのタンパク質、RDH11、RDH12、RDH13、及びRDH14のAL-OL反応活性を測定した結果、RDH14のみがAL-OL反応活性を示した。さらに、マウスRDH14はAL-OL反応活性に加えて、NADP⁺依存的な11-シスレチノール酸化活性も示した。興味深いことに、この反応活性はマウス体温に近い温度条件において特に強く検出された。すなわち、15 °C、25 °CではGST-マウスRDH14にNADP⁺を加えず、A₂型オールトランスレチナールと11-シスレチノールだけを加えた場合（AL-OL反応）の方が高い11-シスレチノール酸化活性を示し、37 °Cにおいては、NADP⁺と11-シスレチノールを加えた場合（NADP⁺依存的反応）の11-シスレチノール酸化活性が、AL-OL反応のものと同等になることが分かった。さらにこの性質は、コイRDH13L、及びコイ錐体にも共通していることが明らかとなった。

本研究で得られたAL-OL反応の触媒酵素に関するこれらの知見から、コイ錐体で起こるAL-OL反応のうち、少なくとも一部はコイRDH13Lが担うことが示された。しかし、この反応にはRDH13L以外の触媒酵素も関与していると考えられる。また、コイ、及びマウスの錐体は、11-シスレチナールを生合成する仕組みとして、AL-OL反応に加えて、NADP⁺依存的な11-シスレチノール酸化反応も利用していることが示唆された。

本研究の背景

脊椎動物の網膜 (図1) では、桿体、錐体と呼ばれる二種類の視細胞によって光が受容される (図2A)。桿体は夜の視覚を、錐体は昼の視覚を司る (図2B)。いずれの視細胞も光受容体として、発色団部分の11-シスレチナールと、タンパク質部分のオプシンから構成される視物質を発現している (図2C)。視物質に光が当たると、その内部にある11-シスレチナールはオールトランスレチナールへと異性化され、それに伴って視物質の構造は活性型へと変化する。そして、活性型の視物質が光情報伝達カスケードと呼ばれる連鎖反応を活性化することで、視細胞の電気的な応答が引き起こされる (Fu and Yau, 2007; Kawamura and Tachibanaki, 2008)。活性型

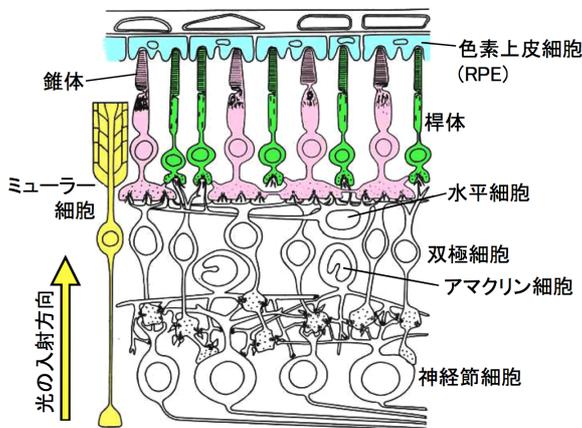


図1 脊椎動物の網膜の模式図 脊椎動物の網膜には上記のいくつかの細胞種から成るが、そのうち視細胞は桿体 (緑)、錐体 (ピンク) の2種類である。図の出典はMiyazono、博士学位論文 (2008)。

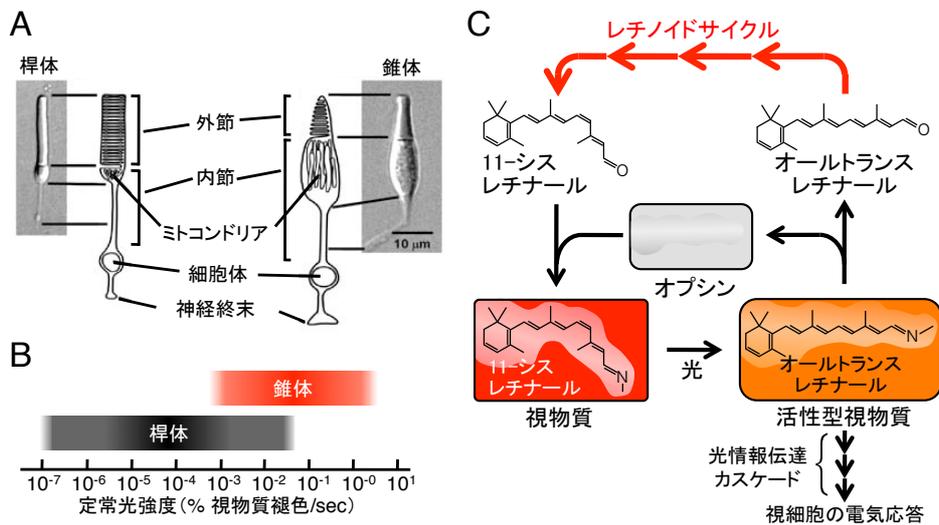


図2 桿体・錐体の特徴と光受容機構の模式図 (A) コイ網膜を絵筆で叩いて単離した各視細胞の顕微鏡写真。横にはそれぞれの模式図を示した。どちらの細胞も外節、内節、細胞体、神経終末から構成される。(B) 桿体と錐体が機能する光強度の範囲、出典は Miyazono、博士学位論文 (2008)。(C) 視細胞で光受容体として働く視物質は、光情報伝達カスケードを活性化した後、オプシンとオールトランスレチナールに分解するが、レチノイドサイクルによって生成した 11-シスレチナールがオプシンと再度結合することで、光を受容できる状態に戻る。

視物質はその後、オプシンとオールトランスレチナールに分解し、光を受容する能力を失う。桿体、錐体両方の視細胞において、褪色後の視物質で生じたオールトランスレチナールはオールトランスレチノールに還元され、直接11-シスレチナールには戻らない。従って、視細胞が光を検出する能力を維持するためには、オプシンに新たに11-シスレチナールを供給して、視物質を再生させる必要がある(図2C)。この11-シスレチナールを供給する仕組みとして、視物質の分解に伴って生じたオールトランスレチノールから、多段階の酵素反応によって11-シスレチナールを合成するレチノイドサイクル(または、ビジュアルサイクル)と呼ばれる代謝経路が知られている。これまでに、脊椎動物の眼球には2種類のレチノイドサイクルが存在することが知られている(Wang and Kefalov, 2011; Kiser *et al.*, 2012; Saari, 2012; Tang *et al.*, 2013)。

第一の、古くから研究されている経路は色素上皮細胞(RPE)が関与する経路である(図3、細い黒矢印)。この経路(RPEレチノイドサイクル)では、視物質の褪色の後に生じるオールトランスレチノールはRPEに輸送され、そこでエステル化、異性化加水分解、酸化反応を経て11-シスレチナールに再合成される(Jin *et al.*, 2005; Moiseyev *et al.*, 2005; Redmond *et al.*, 2005)。RPEで合成された11-シスレチナールは桿体、及び錐体に戻され、視物質の再生に利用される。第二の、近年発見された経路は錐体特異的なレチノイドサイクル(錐体レチノイドサイクル)である(図3、赤矢印)。この経路では、錐体に生じたオールトランスレチノールはミュラー細胞へ輸送され、そこで11-シスレチノールに異性化される(Das *et al.*, 1992; Kaylor

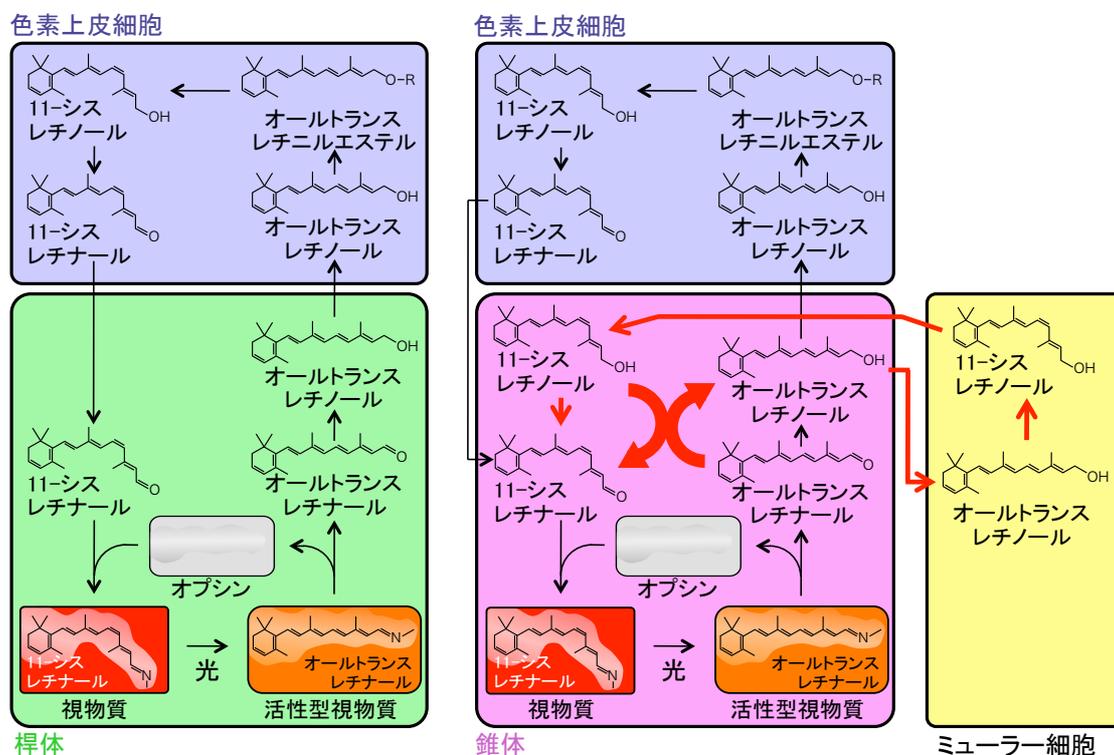


図3 桿体と錐体の視物質再生に関与するレチノイドサイクルの模式図 左が桿体、右が錐体のものを示す。黒矢印は従来から知られている色素上皮細胞経由のレチノイドサイクル(RPEレチノイドサイクル)、赤矢印はミュラー細胞を経由するレチノイドサイクル(錐体特異的レチノイドサイクル)を表す。赤太矢印は本研究の扱うAL-OL反応を示す。

et al., 2013)。その後、11-シスレチノールは錐体に戻され、錐体で11-シスレチナールに酸化されて視物質の再生に利用される (Wang and Kefalov, 2011; Saari, 2012; Tang et al., 2013)。

錐体レチノイドサイクルは錐体視物質の再生に関して重要な役割を担うことが示唆されている。Mata ら (2002) は、錐体レチノイドサイクルがRPEレチノイドサイクルの20倍効率的に錐体視物質を再生すると見積もっている。実際、Kolesnikov ら (2011) は、マウスの網膜において、錐体レチノイドサイクルがRPEレチノイドサイクルの8倍早くM/L錐体の暗順応を促進すると報告している。

単離した錐体に外から11-シスレチノールを投与すると、視物質が再生する。このことから、生体内ではミュラー細胞から錐体に供給された11-シスレチノールが、錐体の中で11-シスレチナールに酸化され、視物質を再生させると考えられている (Jones et al., 1989; Ala-Laurila et al., 2009)。この酸化反応はレチノール脱水素酵素 (RDH) によって、補酵素 NADP⁺ 依存的な反応で行われることが示唆されていた (Mata et al., 2002)。しかし、Miyazono ら (2008) は、精製コイ錐体の膜試料にはその活性がほとんどないことを報告した (図4)。さらに同論文では、同じ試料に対してNADP⁺の代わりにオールトランスレチナールを添加することで、11-シスレチノール酸化活性が検出されることも報告された。この11-シスレチノール酸化反応では、11-シスレチナールの生成に加えてオールトランスレチノールの生成も検出され、その生成量比は1:1であった。このことから、反応では11-シスレチノールが11-シスレチナールへ酸化されると同時に、オールトランスレチノールがオールトランスレチノールに還元されていると推測された (図3、赤太矢印)。このレチナール (AL) 還元とレチノール (OL) 酸化共役反応 (AL-OL反応) は、その反応最大速度においてRPEレチノイドサイクルの240倍効率良く錐体に11-シスレチナールを供給することが予想された (Miyazono et al., 2008)。また、同反応の活性は精製コイ桿体からは検出されなかった。これらの特徴から、AL-OL反応は錐体レチノイドサイクルにおいて、視物質で生じたオールトランスレチナールを利用して、ミュラー細胞から供給される11-シスレチノールを効率良く11-シスレチナールに酸化する仕組みであることが予想された (図3 赤太矢印)。そこで、本研究ではAL-OL反応の反応特性 (第一章) と、反応を触媒する酵素 (第二章) を解析することで、反応の役割や分子メカニズムに対する理解を深めることを目的とした。



図4 コイ錐体が持つ新規の11-シスレチナール生成反応、AL-OL反応 (左) 11-シスレチナール生成反応の反応式。(右) 基質Bとして、補酵素NADP⁺を使用した場合、活性はほとんど検出されなかったが、オールトランスレチナールを使用したところ、高い活性が検出された。

第一章 AL-OL反応の特性解析

序論

本章では最初に、AL-OL 反応が実際にレチノールとレチナールの間で起こる酸化還元共役反応であることを確認した。その後、この反応の特性をさらに明らかにする目的で、酸化、還元両反応の基質特異性、反応機構、及び反応活性の細胞内局在について検討を行った。酸化反応は11-シスレチノールと9-シスレチノールに高い特異性を示したのに対して、還元反応は様々なアルデヒドに反応性を示した。このことから、本研究では反応の名称をレチナール-レチノール酸化還元共役反応から、より一般的に適用できる「アルデヒド-アルコール酸化還元共役反応」に変更した。ただし、その略称はこれまでと同じ AL-OL 反応とした。反応機構解析の結果から、AL-OL 反応を触媒する酵素はアルデヒドとレチノールそれぞれに対応する基質結合部位を持つことが示唆された。細胞内局在解析の結果からは、反応を触媒する酵素が内節、おそらくエリプソイド部分の膜に強く結合するものであることが示唆された。これらの結果を踏まえて、本論文の考察部分では AL-OL 反応の機能メカニズムについて考察する。

実験方法

コイ錐体膜試料の調製

コイ (*Cyprinus carpio*) の錐体視細胞はTachibanaki ら (2005) に記載された方法で調製した (図5)。実験動物の取り扱い、大阪大学動物実験規程に従って行った。本法で調製される精製錐体は外節とエリプソイド部分を保持しているが、核とシナプス末端を失っている (図2、または図5の写真)。調製した精製錐体試料に含まれる錐体の数は、その一部を光学顕微鏡で観察することによって見積もった。本研究ではその見積もりを用いて、AL-OL反応活性を錐体1個あたりという単位 (amols/cone/sec) で表した。錐体膜試料は以下の方法で調製した。精製錐体を凍結融解で破砕し、グルコン酸カリウム緩衝液 (115 mM グルコン酸カリウム、2.5 mM 塩化カリウム、2 mM 塩化マグネシウム、0.2 mMグリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA)、0.1 mM 塩化カルシウム、1 mM ジチオスレイトール (DTT)、10 mM 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1ピペラジニル]エタンスルホン酸 (HEPES) -水酸化カリウム)、pH 7.5) で3回、遠心分離 ($104,000 \times g$ 、 4°C 、15 min) によって洗浄した。洗浄操作後の膜試料は液体窒素で急速冷凍し、使用直前まで -80°C で保管した。

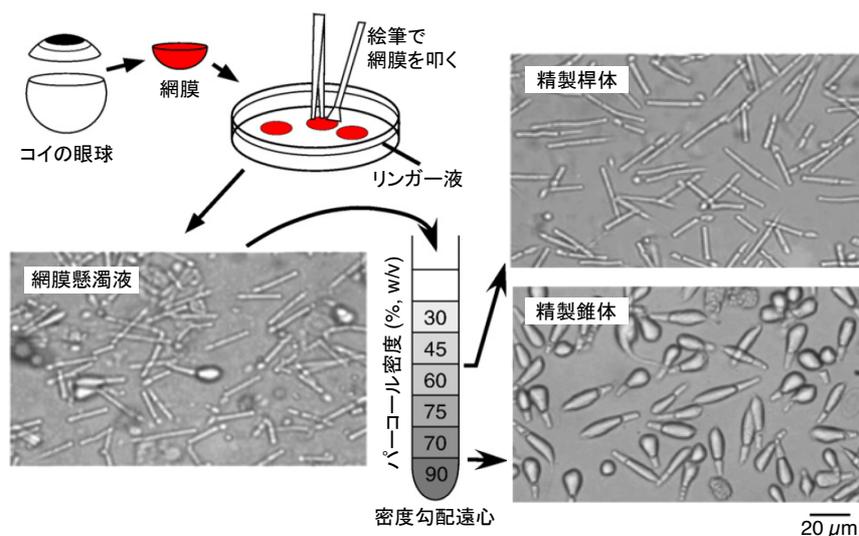


図5 コイ精製桿体と精製錐体を調製する方法 (Tachibanaki *et al.*, 2005) の概略 写真は各試料の光学顕微鏡観察像。精製コイ錐体画分に含まれる大半の細胞が錐体である事が確認できる。

基質特異性解析と酵素反応速度論的な解析には、保管した錐体膜試料を融解した後、グルコン酸カリウム緩衝液に懸濁した試料を使用した。活性の膜局在解析に使用した試料の調製ではまず、Tachibanaki ら (2005) の方法で新たに調製した精製錐体を凍結融解で破砕し、グルコン酸カリウム緩衝液で1回、遠心分離 ($104,000 \times g$ 、 4°C 、15 min) によって洗浄した。必要な場合は、この遠心分離で得られた上清を回収した。得られた膜の沈殿は等張緩衝液 (グルコン酸カリウム緩衝液)、低張緩衝液 (2 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、10 mM

HEPES-KOH、1 mM DTT、pH 7.5)、高張緩衝液 (600 mM 塩化ナトリウム、10 mM HEPES-KOH、1 mM DTT、pH 7.5)、または界面活性剤入り緩衝液 (0.48 mM ドデシル- β -D-マルトシド (DDM)、10 mM HEPES-KOH、pH 7.5) に懸濁した。その後、界面活性剤入り緩衝液に懸濁した試料は4 °Cで30 分間回転混合したが、他の試料ではこの操作を省いた。このようにして調製した各種の膜懸濁液を遠心分離 ((104,000 $\times g$ 、4 °C、20 min) し、可溶性タンパク質を含む上清画分と膜を含む沈殿画分とに分離した。最後に、これらの上清画分と、沈殿画分を再度グルコン酸カリウム緩衝液に懸濁した試料それぞれのAL-OL反応活性を測定した。

活性の細胞内局在解析においては、ショ糖不連続密度勾配法を用いた方法 (Miyazono *et al.*, 2008) を一部改変した方法 (Fukagawa *et al.*, 未発表データ) で、錐体外節膜を多く含む試料 (outer segment-rich、OS-rich) と錐体内節膜を多く含む試料 (inner segment-rich、IS-rich) を調製した (図6)。回収した各膜試料はグルコン酸カリウム緩衝液に懸濁して使用した。各試料中のタンパク質は、SDS-PAGE法で分離した後、クーマシー・ブリリアントブルー (CBB) で染色し、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準試料として用いて定量した。また、錐体視物質は分光学的な手法 (Okano *et al.*, 1989; Tachibanaki *et al.*, 2001) で定量した。各試料の純度は総タンパク質量に対する錐体視物質質量の割合から判断した。

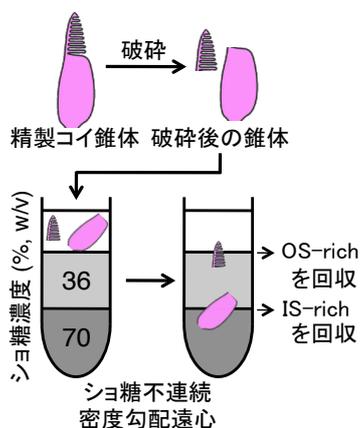


図6 コイ精製錐体から OS-rich、及び IS-rich 画分を調製する方法 (Fukagawa *et al.*, 未発表データ) の概略 破碎処理は、リンガー液の2倍の濃度組成を持つ緩衝液に懸濁した錐体を、ゲージ27の注射針を用いて勢い良く数十回吸引、吐出を繰り返すことで行った。その後、破碎した錐体からショ糖不連続密度勾配遠心で外節主要画分 (OS-rich) と内節主要画分 (IS-rich) とを分離した。模式的に外節と内節が完全に分離するように描いたが、実際には外節主要画分に内節が、また、内節主要画分に外節が混入する。

レチノイドと9-シスレチノールアナログの調製

特に記さない限り、レチノイドはA₁型のものを使用した。オールトランスレチノールと9-シスレチノールはSigma-Aldrich社から購入したものを、3-デヒドロオールトランスレチノール (A₂型オールトランスレチノール) は大阪教育大学の關隆晴教授のご厚意により譲渡して頂いたもの、または、Toronto Research Chemicals社から購入したものを使用した。他のレチノール異性体、即ち11-シスレチノールと13-シスレチノールはMatsumoto ら (2003) に記載された方法で調製した。約10 mgのオールトランスレチノールを、終濃度約10 mMになるよう4 mlのアセトニトリルに溶解し、15 Wの蛍光灯の光を4 °Cで1日間照射することで異性化処理した。試料に窒素を吹き付ける事で溶媒を蒸発させた後、得られたレチノール異性体の混合物を、終濃度が約40 mMになるよう、1 mlのジエチルエーテル/n-ヘキサン (15:85) に溶解した。以降

の操作は精製したレチナールの光異性化を防ぐために赤色照明下で行った。レチナール異性体混合液に含まれる各異性体は分取用順相カラム (Develosil 60-5、野村科学) を装着したHPLCシステム (LC-800、JASCO) を使用して分離した。カラムからのレチナールの溶出は、溶出液の350 nmにおける吸光度を経時的に測定して描いたクロマトグラムによって確認し、クロマトグラム上のそれぞれのピークに対応する溶出液をレチナール溶液としてガラス試験管に回収した。回収したレチナール異性体の同定と定量は、各試料の吸収スペクトルを測定して文献 (Zonta and Stancher, 1984; Liu and Asato, 1984) と比較する事で行った。得られたレチナール溶液は窒素を吹き付けて溶媒を蒸発させた後、エタノールを加えて再度レチナールを溶解し、使用するまで-80 °Cで保管した。

各レチノール異性体は、対応するレチナール異性体を還元して調製した (Suzuki and Makino-Tasaka, 1983)。各レチナール異性体のエタノール溶液100-300 μ lに約6 mgの水素化ホウ素ナトリウムを加え、30-60 分間氷上に静置して還元反応を行わせた。その後、水素化ホウ素ナトリウムを水層に分離する目的で、試料の最終量が500 μ lになる量の超純水を加えた。試料中のレチノールは450 μ lの溶媒A (ベンゼン/*tert*-ブチルメチルエーテル/エタノール/*n*-ヘキサン、10:5:0.2:85、体積比) で2回抽出した。得られたレチノール溶液は窒素を吹き付けて溶媒を蒸発させた後、エタノールを加えて再度レチノールを溶解し、使用するまで-80 °Cで保管した。9-シスレチノールのアナログは以下の方法で、神戸薬科大学の和田昭盛教授の研究室で合成して頂いた。テトラエノール誘導体 (6*Z*-3,7-ジメチル-9-フェニル-2,4,6,8-ノナテトラエン-1-オール、図7A) を得るために、まず、フェニルアセトアルデヒドと*N*-フェニル-ビス (トリフルオロメタンスルホイミド) の反応 (Wada *et al.*, 2004) で得られたトリフレイト (1.0等量) とテトラエニルスタンニルエステル (1.3等量) (Pazos *et al.*, 2001) を脱水したジメチルホルムアミド (4 ml) に溶解した後、フッ化セシウム (2.0等量)、テトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (0) (10 mol %)、及びヨウ化銅 (20 mol %) を添加した。反応に使用するフラスコは、内部の空気をアルゴンで5回排気してから使用した。上記の混合試料を40-45 °Cで15時間攪拌混合し、室温まで冷却した後、水を加えて反応を停止させ、その反応産物をエーテルで抽出

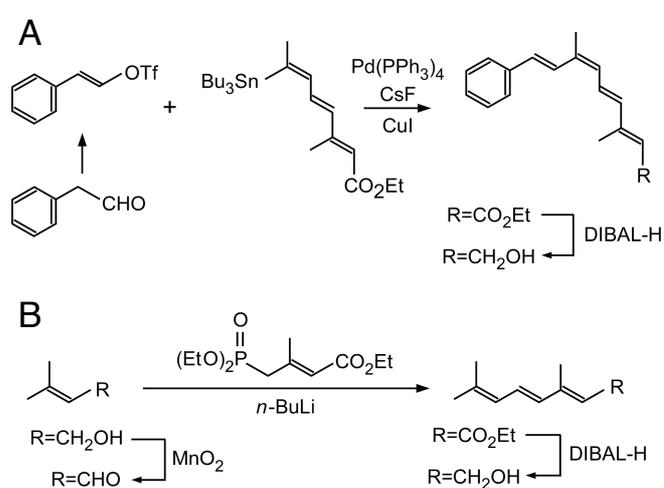


図 7 9-シスレチノールアナログの合成過程 (A) テトラエノール誘導体 (6*Z*-3,7-ジメチル-9-フェニル-2,4,6,8-ノナテトラエン-1-オール) の合成法。(B) トリエノール誘導体 (3,7-ジメチル-2,4,6-オクタトリエン-1-オール) の合成法。DIBAL-H: 水素化ジイソブチルアルミニウム、OTf: O-トリフルオロメタンスルホニル

した。回収した有機層は硫酸二ナトリウムで脱水した後、ろ過し、溶媒を蒸発させた。得られた残留物を中和した二酸化ケイ素／粉末フッ化カリウム (9:1) を使用したカラムクロマトグラフィーで精製することでカップリング反応産物のエステルを得た。得られた精製試料 (1等量) をジクロロメタン (3 ml) に溶解し、0 °Cに冷却した後、水素化ジイソブチルアルミニウム (DIBAL-H、1 Mトルエン溶液、2.2等量) を加え、室温で1時間攪拌混合した。処理後の溶液は水溶性シリカゲル (水:二酸化ケイ素=1:4) で反応を停止し、さらに1時間攪拌混合した後、Celite (World Minerals社) でろ過し、硫酸二ナトリウムで脱水した。溶媒を除去した後、残留物をシリカゲルとヘキサン／エチルアセテート (10:1) を使用したカラムクロマトグラフィーで精製することで目的のテトラエノール誘導体を得た。

トリエノール誘導体 (3,7-ジメチル-2,4,6-オクタトリエン-1-オール、図7B) を得るために、脱水したジクロロメタン (20 ml) 中に3-メチル-2-ブテン-1-オール (1 mmol) と二酸化マンガン (25 mmol) を混合し、室温で6時間攪拌混合した。その後、試料をCeliteでろ過して得たろ液を減圧濃縮した。得られた残留物をシリカゲルとエーテル／ヘキサン (1:4) を使用したカラムクロマトグラフィーで精製し、アルデヒド体を得た。その後、トリエチル-3-メチル-4-ホスホクロトン酸 (1.1 mmol) と*N,N'*-ジメチルプロピレン尿素 (3.5 mmol) をテトラヒドロフラン (5.5 ml) 中に混合した試料に*n*-ブチルリチウム (1.1 mmol) のヘキサン溶液を0 °Cで加えた。30分間の攪拌混合を行った後、溶液を-78 °Cに冷却し、前の操作で得たアルデヒド体 (1 mmol) のテトラヒドロフラン (3 ml) 溶液を添加した。混合試料にさらに2時間攪拌混合を加えた後、飽和塩化アンモニウムを加えて反応を停止させ、ジエチルエーテルで反応生成物を抽出した。得られた有機層を硫酸二ナトリウムで脱水し、ろ過した後、溶媒を蒸発させた。得られた残留物をシリカゲルとヘキサン／酢酸エチル (10:1) を使用したカラムクロマトグラフィーで精製し、得られたエステルをDIBAL-Hを使用する前述の方法によって処理することで目的のトリエノール誘導体を得た。

AL-OL反応活性の測定

AL-OL反応活性の測定は、レチナールの光異性化が起こらず、かつ視物質の褪色が反応活性に影響しないような弱い赤色光照明下で行った。反応の基質として、レチノールを含むアルコール各種、レチナールを含むアルデヒドやケトン各種を用いた。まず、約10-30万個のコイ精製錐体から調製した膜懸濁液 (100 μ l) を5 mlガラスバイアルに分注した後、0.5 μ lのエタノールに溶解したアルコール基質とアルデヒド／ケトン基質を別々に加えた。ただし、ケトンの一種、ユビキノンはエタノールにほとんど溶けないため、1,4-ジオキサンに溶解したものを添加した。基質を添加した試料は、25 °Cで5-10分間静置して反応させた。対照実験として、基質のどちらか片方を加えない試料も同じ条件で反応させた。反応は氷冷メタノール300 μ lを添加することで停止させた。試料中のレチナール異性体は、Irie and Seki (2002) の方法を一部改変した方法を用いてオキシム体として抽出した。

まず、試料に1 M ヒドロキシルアミン (pH 7.5) 100 μ lを添加した後、25 °Cで40分間反応させた。反応後、レチノイド、即ちレチナールオキシムとレチノールを溶媒Aで2回抽出した。試料の溶媒を蒸発させた後、残留物を溶媒A 100 μ lに溶解した。抽出物に含まれる各レチノイドは、移動相として溶媒Aを、固定相として分析用順相カラム (Cosmosil 5SL-II、ナカライ

テスク) を用いたHPLCで分離し、カラムからの溶出液の350 nmにおける吸光度を経時的に測定することで検出した (図8)。各レチノイドの同定、及び定量は、その保持時間とピーク面積値を既知量の標準試料と比較することで行った。なお、ここで用いた標準試料の定量はHubbardら (1971)、及び Trehan ら (1990) に記載されたモル吸光計数を用いて、分光学的な手法で行った。反応液に加えたレチノイドは一部が熱的に異性化する (Miyazono *et al.*, 2008)。その影響を差し引くため、AL-OL反応活性はアルデヒド基質、あるいはアルコール基質のどちらかを加えない対照実験におけるレチノイド検出量を差し引いて算出した (図8B-D)。AL-OL

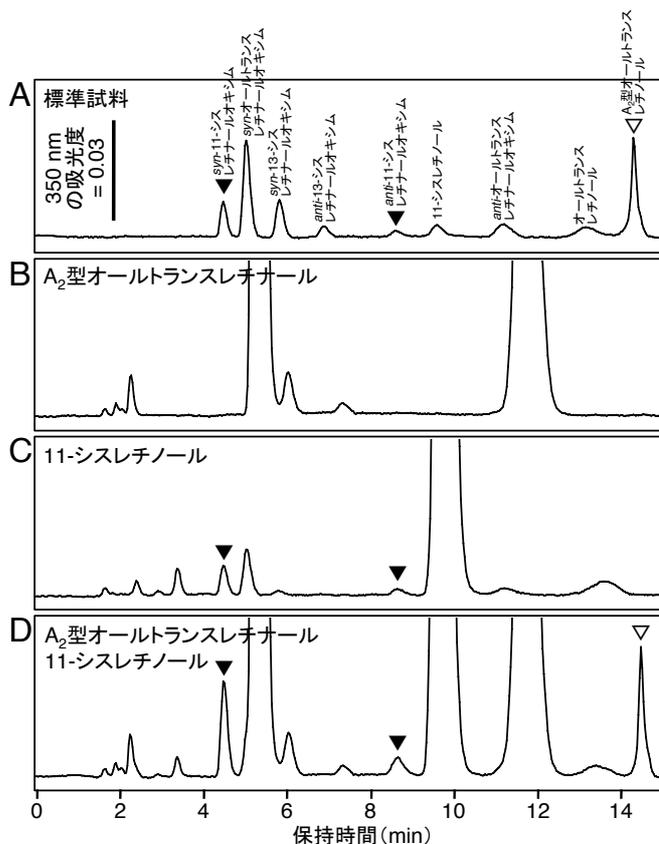


図8 HPLCでのレチノイドの分析とAL-OL反応活性の測定方法 アルデヒドとしてA₂型オールトランスレチナル、アルコールとして11-シスレチノール、試料としてGST-マウスRDH14溶液(第二章を参照されたい)を用いてAL-OL反応活性を測定したときの例を示した。(A) 各レチノイドの保持時間を示す標準試料の分析結果。各ピークに対応するレチノイドの名前をピークの上に記し、特にAL-OL反応生成物として得られることが予想される11-シスレチナルのオキシム(オキシム化処理に伴って*syn*型、*anti*型という2種類の立体異性体が生成する；▼)とA₂型オールトランスレチノール(▽)の溶出位置については矢頭で強調して示した。(B) コントロールとして、アルコールは加えずA₂型オールトランスレチナルだけを添加した反応液中のレチノイド。溶出時間5.5分、及び12分あたりの2本のピークがそれぞれA₂型オールトランスレチナルの*syn*型、*anti*型に相当するピークである。試料と混合放置することでA₂型オールトランスレチナルから熱的に生じた異性体(おそらく13-シス型)の*syn*型、*anti*型に相当するピークがそれぞれ溶出時間6分、及び7.5分あ

たりに観察されるが、A₂型オールトランスレチノールに相当するピークは検出されない。(C) コントロールとして、アルデヒドは加えず、11-シスレチノールだけを添加した反応液中のレチノイド。溶出時間10分あたりの最大のピークが11-シスレチノールに相当するピークである。試料と混合放置することで、11-シスレチノールからAL-OL反応非依存的に11-シスレチナル(▼)が生成したことが確認される。その他には、溶出時間5分、及び11.5分あたりにはオールトランスレチナルの*syn*型、*anti*型にそれぞれに相当するピークが、13.5分あたりには11-シスレチノールから熱的に生じた異性体(オールトランスレチノール)に相当するピークがそれぞれ検出される。しかし、この試料ではAL-OL反応の生成物、A₂型オールトランスレチノールに相当するピークは検出されない。(C) アルデヒドとしてA₂型オールトランスレチナル、アルコールとして11-シスレチノールを同時に試料と混合放置し、AL-OL反応を行わせるとき、反応液中に生じたレチノイド。この条件でのみ、A₂型オールトランスレチナル(▽)の生成が観測され、その分量に見合う分だけの11-シスレチナル(オキシム体；▼)の生成が認められた。AL-OL反応活性は(D)における反応生成物(A₂型オールトランスレチノールと11-シスレチナル)の検出量から、コントロールである(B)、及び(C)での該当生成物の検出量を差し引く事によって算出した。

反応ではアルコールからアルデヒドが、また、アルデヒドからアルコールが 1:1 の比で生成するため、活性は片方の生成物、即ちアルデヒド、あるいはアルコールの生成量として測定した。可能な場合は、両方の生成物を定量してアルデヒドとアルコールの生成量比が 1:1 であることを確認したが、非レチノイド基質を用いた一部の測定においては生成物の片方である非レチノイド生成物を定量していない。

AL-OL反応の反応速度論的な解析

AL-OL反応は二基質反応であり、この種の反応には2種類の反応機構があることが知られている。それは、逐次反応と、ピンポン反応である (Bisswanger, 2008)。AL-OL反応が何れの反応なのかを区別するため、11-シスレチノールとベンズアルデヒドを、様々な濃度の組み合わせで錐体膜試料に加え、AL-OL反応活性測定を行い、反応速度論的な解析を行った。

結果

AL-OL反応が酸化還元共役反応である事を示す証拠

先行研究において、コイ錐体膜試料に11-シスレチノールと共にオールトランスレチナールを添加すると、それぞれに対応するアルデヒドとアルコール、即ち11-シスレチナールとオールトランスレチノールが1:1の比で生じる事が示されていた (Miyazono *et al.*, 2008)。これら生成物の量比から、反応は11-シスレチノールが11-シスレチナールに酸化されると同時に、オールトランスレチナールがオールトランスレチノールに還元されるもの (図9A) であると予想された。この仮説を検証するため、そして、生成物が異性化によって生じた可能性、即ち11-シスレチナールはオールトランスレチナールが異性化して生じ、オールトランスレチノールは11-シスレチノールが異性化して生じた、という可能性 (図9B) を否定するため、アルデヒド基質として3-デヒドロオールトランスレチナール (A_2 型オールトランスレチナール) を、アルコール基質として通常の11-シスレチノール (通常型は A_1 型と呼ばれるがこの部分は省略されることが多いので以下では単に11-シスレチノール、あるいは、アルデヒドの場合、11-シスレチナールと呼ぶ。他の異性体についても同様に A_1 型の場合、この呼称は省略する) を反応させ、その反応生成物を分析した。その結果、生成物として検出されたのは11-シスレチナールと A_2 型オールトランスレチノールであった (図9C)。また、この反応では、11-シスレチナールと A_2 型オールトランスレチノールはほぼ1:1の比で生じ (図9C)、先行研究 (Miyazono *et al.*, 2008) と同様に、補酵素の添加は必要ではなかった。先行研究では、反応産物のアルデヒドとアルコールの生成量が1:1であることから、AL-OL反応は酸化還元共役反応 (図9A) であろうと推測していたが、この実験によってその推測が正しかったことがはっきりと示された。

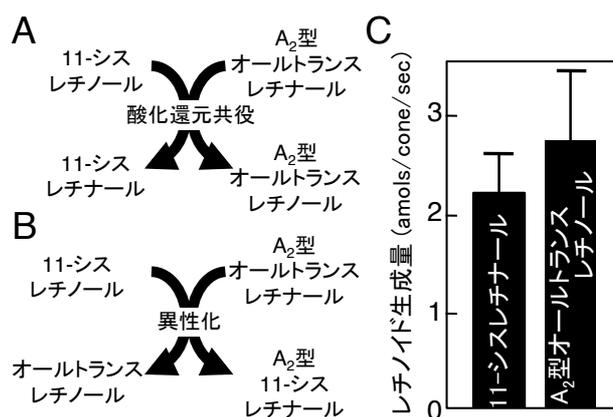


図9 AL-OL反応が酸化還元反応であることの証拠 (A-B) 11-シスレチナールが反応産物として生成することを説明し得る反応機構として、酸化還元共役 (A) と異性化 (B) が考えられた。(C) A_2 型オールトランスレチナールと11-シスレチノールを錐体膜試料存在下で反応させ、生成物を分析・定量した結果、 A_2 型オールトランスレチノールがアルコール体に還元されたことを確認した ($n=3$, 平均値 \pm 標準偏差)。

AL-OL反応の基質特異性

1. アルデヒド基質の特異性

生体内におけるAL-OL反応の役割を理解する上で、反応の基質特異性を知る事は重要な手がかりとなる。そこでまず、AL-OL反応を構成する2つの反応のうち、アルデヒド還元反応の基質特異性について、レチナール立体異性体を含む様々なアルデヒド/ケトン化合物を250 μ Mの濃度で反応させ、検討した (図10)。この測定では、アルコール基質に11-シスレチノール (250 μ M) を使用し、AL-OL反応活性はアルデヒド/ケトン依存的な11-シスレチナール生成量から決定した (図10左)。図10に示した通り、多数のアルデヒド、即ちオールトランス、9-シス、13-シスレチナール、A₂型オールトランスレチナール、ベンズアルデヒド、中鎖アルデヒド (ドデカナール、ノナナール、ヘキサナール)、シトラール、及びトリエナール誘導体が顕著な活性を示した。検出された活性は、アルデヒドの種類に関わらずほぼ同じ値となり、その範囲はシトラールでの 1.03 ± 0.03 (amols/cone/sec) から、9-シスレチナールでの 5.3 ± 1.6 (amols/cone/sec) だった。その一方、ペンタナール、3-メチル-2-ブテナール、アセトアルデヒド、ケトン (β -イオン、ユビキノ) はほとんど基質として働かなかった。4-ヒドロキシ-2-ノネナールは、ドコサヘキサエン酸のような多価不飽和脂肪酸の過酸化によって生じることや、光照射条件下の網膜で生じることが知られている (Tanito *et al.*, 2005) が、これも基質として

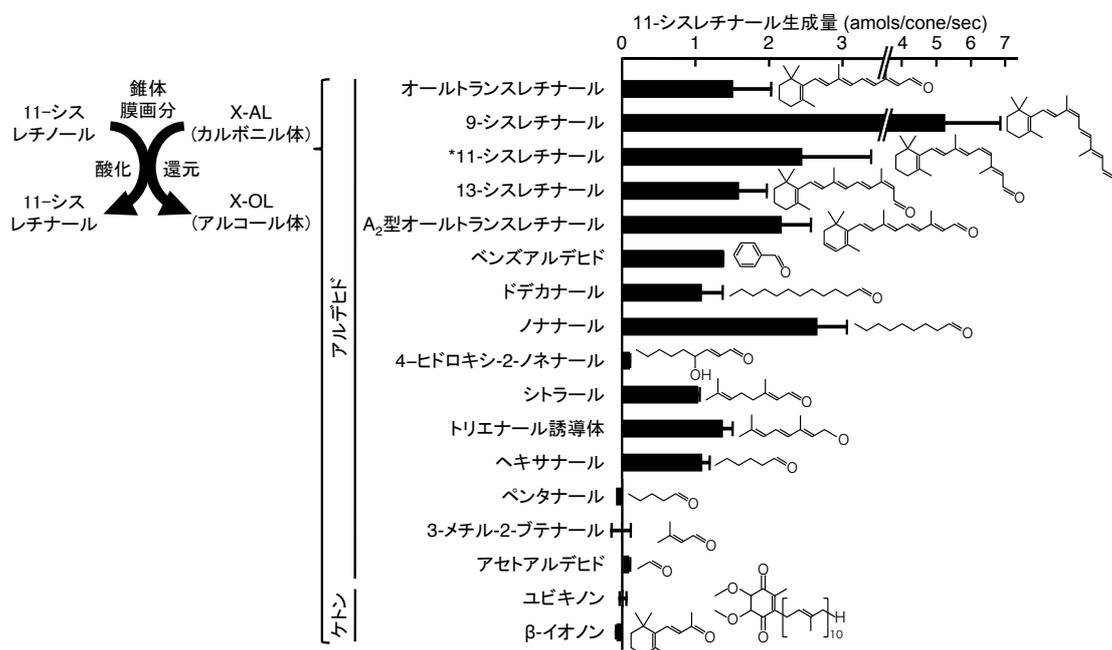


図10 各アルデヒド/ケトン (カルボニル) 化合物に対する AL-OL 反応活性 各基質 (250 μ M) と 11-シスレチノール (250 μ M) を錐体膜試料存在下で反応させた。生成物の 11-シスレチナールを定量し、その生成速度を棒グラフで表した (実験例数 $n > 3$ については平均値 \pm 標準偏差を、実験例数 $n = 2$ の場合は平均値 ± 2 回の測定のばらつきをそれぞれ示した。オールトランスレチナールは $n = 16$ 、他は $n = 2-3$)。グラフ内には各基質の構造を示した。*11-シスレチナールに対する活性を測定する際は、アルコール基質として 9-シスレチノールを反応させ、活性は 11-シスレチノールの生成量から算出した。

ほとんど働かなかった。注目すべき点として、Reinheckel ら (1998) が、酸化ストレス条件下のミトコンドリアにおいて生じることを報告したノナンール、及びヘキサナールが有効な基質となったことが挙げられる (図 10)。なお、11-シスレチナールも基質として有効かどうかを検討したが、この測定ではアルコール基質として 11-シスレチノールの代わりに 9-シスレチノールを使用し、反応活性は 11-シスレチノールの生成量で決定した (9-シスレチノールも使用できることを示したデータは図 11A に示す)。

図10に示すように、250 μM のペンタナールと3-メチル-2-ブテナールは活性を示さなかった。しかし、これらのアルデヒドもその濃度を上昇させることで顕著な活性を示した (1 mM ペンタナールでは 0.44 ± 0.03 amols/cone/sec、2.5 mM 3-メチル-2-ブテナールでは 0.43 ± 0.12 amols/cone/sec、値は平均値 \pm 2回の実験のばらつき)。その一方、アセトアルデヒドは8.9 mMでも、ケトン (β -イオン、ユビキノン) は2.5 mMの濃度でも活性を示さなかった。これらのことから、炭化水素鎖を持つアルデヒドならばAL-OL反応の基質として働き得るが、反応を触媒する酵素に対する親和性はその炭素鎖の長さに正に相関すると推測している。実際、これまでに炭素鎖の長さが異なる4種類のアルデヒドについて決定したミカエリス定数 K_m について、この推測と矛盾しない結果が得られている (表1)。 K_m は、酵素に対する親和性が高い基質ほど、小さな値になる。使用した4種類のアルデヒドは、分子内の炭素間結合のタイプや、主鎖へのメチル基付加の有無に関して違いがあるのにも関わらず、その主炭素鎖の長さ、 K_m の値に負の相関が見られた。一方、同時に得られた反応最大速度 V_{max} の値は、試したアルデヒドの間でほとんど差がなく、その範囲は1-ドデカナールでの 1.8 ± 0.8 (amols/cone/sec) から、3-メチル-2-ブテナールの 2.8 ± 1.0 (amols/cone/sec) であった。

表 1 各アルデヒド化合物のミカエリス定数 K_m と反応最大速度 V_{max} 各アルデヒドについて、数通りのアルデヒド濃度における AL-OL 反応速度を、11-シスレチノール (250 μM) と錐体膜の存在下で測定した。得られた反応速度をアルデヒド濃度に対してプロットし、ミカエリスメンテン式に対してフィッティングする事でミカエリス定数 K_m と反応最大速度 V_{max} を得た。 K_m と V_{max} は平均値 \pm 標準偏差 (n=4)、または平均値 \pm 2回の測定のばらつき (n=2) で示す。

アルデヒド	炭素鎖の長さ	K_m (μM)	V_{max} (amols/cone/sec)	試行数
1-ドデカナール	12	22 ± 9	1.8 ± 0.8	4
シトラール	8	310 ± 130	2.3 ± 0.5	2
ペンタナール	5	6000 ± 1700	2.5 ± 0.3	2
3-メチル-2-ブテナール	4	18900 ± 7000	2.8 ± 1.0	4

K_m , V_{max} は平均値 \pm 標準偏差(n=4)、または値のばらつき(n=2)で示す。

2. アルコール基質の特異性

アルコールの酸化反応についてはまず、オールトランス、9-シス、11-シス、13-シスレチノールについて検討した。この測定において、アルデヒド基質としてオールトランスレチノールを使用すると、反応中に様々なシス、トランス異性体が生じ、複雑な結果となることが予想された。この問題を回避するため、アルデヒド基質としてベンズアルデヒドを使用し、レチ

ノールの酸化反応産物を定量することでAL-OL反応活性を測定した(図11A、左)。なお、既に図10に示した通り、ベンズアルデヒドはAL-OL反応のアルデヒド基質として働く事ができる。レチノール基質(250 μ M)とベンズアルデヒド(5 mM)を錐体膜懸濁液に加え、反応させた結果、11-シスレチノールと9-シスレチノールだけが基質として働き、オールトランスレチノールと13-シスレチノールは働かなかった(図11A)。活性は、11-シスレチノール(5.8 \pm 0.6 amols/cone/sec)よりも、9-シスレチノールの方がやや高かった(8.7 \pm 1.2 amols/cone/sec)。ここで、11-シスレチノールとベンズアルデヒドの組み合わせで測定された活性(5.8 \pm 0.6 amols/cone/sec)が図10に示した活性(1.383 \pm 0.004 amols/cone/sec)と比べて約4倍高いが、これは用いたベンズアルデヒドの濃度が、図10では250 μ Mなのに対して、この実験では5 mMと高いことに因る。

オールトランスレチノールと13-シスレチノールが基質として働かない事を確かめるために、2.5 mMという10倍高いレチノール濃度でも同様の測定を行った。その結果、オールトランスレチノールでは活性が全く検出されなかった。一方、13-シスレチノールは活性を示したが、その値は250 μ Mの11-シス/9-シスレチノールと比べても小さい値(1.2 \pm 0.1 amols/cone/sec、値は平均値 \pm 2回の実験のばらつき)であった。

アルコールの酸化反応の基質特異性について、さらに検討を行うため、9-シスレチノールの類似体(トリエノール誘導体とテトラエノール誘導体)について、250 μ Mの濃度で活性測定を行った(図11B)。この測定では、オールトランスレチノール(250 μ M)をアルデヒド基質として使用し、生じたオールトランスレチノールをAL-OL反応の生成物として定量した(図

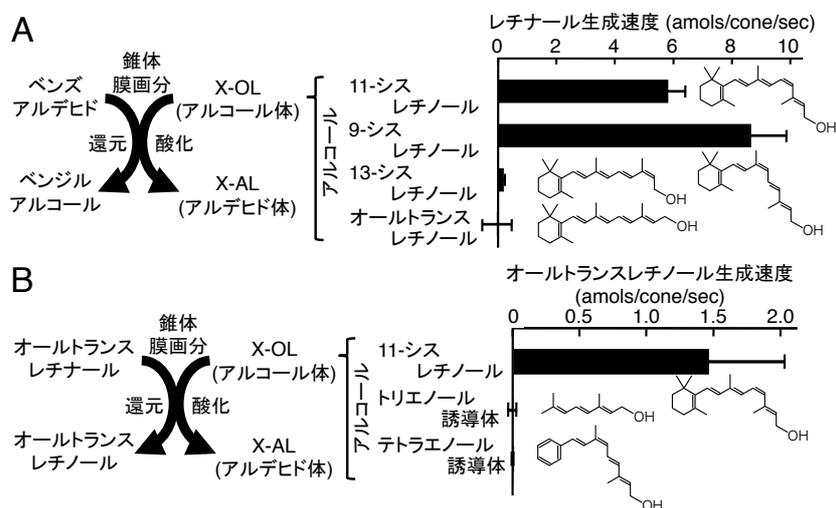


図11 各アルコール化合物に対するAL-OL反応活性 (A)各レチノール異性体(250 μ M)とベンズアルデヒド(5 mM)を錐体膜試料存在下で反応させた。反応で生成した各レチノール異性体を定量し、その生成速度を棒グラフで示した。(B)オールトランスレチノール(250 μ M)存在下で2種類の9-シスレチノールアナログ(トリエノール誘導体、及びテトラエノール誘導体、いずれも250 μ M)に対する活性を測定した。この反応の片方の生成物であるオールトランスレチノールを定量し、その生成速度を棒グラフで示した。ポジティブコントロールには11-シスレチノール(250 μ M)を使用した。グラフ内には各アルコール化合物の構造を示した。結果は平均値 \pm 標準偏差(n>3)、または平均値 \pm 2回の測定のばらつき(n=2)で表した。

11B 左)。ここで図 11A と異なる方法を用いた理由は、トリエノール誘導体とテトラエノール誘導体の酸化物は両方、定量することが困難だったためである。検討の結果、アルデヒド体であるトリエノール誘導体は基質として働いた (図 10) のにも関わらず、そのアルコール体であるトリエノール誘導体は基質として働かなかった (図 11B)。同様に、テトラエノール誘導体も基質として働かなかった (図 11B)。(ただし、テトラエノール誘導体のアルデヒド体については活性測定が困難だったため、測定していない。) これら 2 種の誘導体に加えて、表 2 に示した各アルコール化合物に関しても同じ条件で検討を行ったが、活性は検出されなかった。これらの結果から、AL-OL 反応の酸化反応は 9-シスレチノールと 11-シスレチノールに対して高い特異性を持つことが示された。

表 2 AL-OL 反応の基質として働かなかったアルコール化合物 図 11 に挙げた化合物に加えて、下記のアルコール化合物を図 11B と同じ条件で試したが、基質として働かなかった。

名称	構造
ゲラニオール (E)-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol	
ネロール (Z)-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol	
ゲラニルゲラニオール (2E,6E,10E)-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-ol	
ファルネソール (2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-ol	
テトラエノール誘導体 (2E,4E,6E)-3,7,11-trimethyl-2,4,6,10-dodecatetraen-1-ol	
フェニルトリエノール誘導体、E体 (2E,4E,6E)-7-phenyl-3,7-dimethyl-2,4,6-heptatrien-1-ol	
フェニルトリエノール誘導体、Z体 (2E,4E,6Z)-7-phenyl-3,7-dimethyl-2,4,6-heptatrien-1-ol	
フェニルテトラエノール誘導体、E体 (2E,4E,6E,8E)-9-phenyl-3,7-dimethyl-2,4,6,8-nonatetraen-1-ol	

AL-OL反応の反応機構

AL-OL反応はアルコール基質とアルデヒド基質を利用する二基質反応である。二基質反応の反応機構として、2種類の機構が考えられる。一つは両方の基質がともに結合した後、反応が起こり、生成物が解離する反応機構である (逐次反応)。もう一つは第一の基質がまず酵素に結合、反応して第一の生成物が生じた後、第二の基質が結合、反応して第二の生成物が生じる反応機構 (ピンポン反応) である。反応が何れの機構で起こるのかは、片方の基質濃度を数

通りに固定した条件で、もう片方の基質濃度を变化させて反応活性を測定し、その結果に対して反応速度論的な解析を行うことで推測することができる。即ち、基質濃度と酵素活性の両逆数プロットをとった時、逐次反応機構の場合は一点で交わる直線群が得られ、ピンポン反応機構の場合は平行線群が得られる (Bisswanger, 2008)。そこで、AL-OL反応の反応機構を推測するために、この測定と解析を行った。

11-シスレチノールとベンズアルデヒドを様々な濃度の組み合わせで錐体膜試料に加えて反応させ、AL-OL反応活性を測定した。その結果として、図12に3通りのベンズアルデヒド濃度におけるAL-OL反応速度を、11-シスレチノール濃度に対してプロットしたものを示した。一般に二基質反応が逐次反応であるかピンポン反応であるかは両逆数プロットで判断できるとされている。しかし、両逆数プロットを作図すると、基質濃度が高くて信頼性のある実験値が作図上過小評価される。そのため、本研究では逆数ではなく測定された実数値を使い、理論式でうまくフィッティングできるかどうか検討することにした。予備的に両逆数プロットしてみたところ、得られる直線は一点で交わると考えて矛盾が無さそうであることが分かったので、反応は逐次反応であると考え、その理論式を用いて実数値でフィッティングした。その理論式は

$$v = V_i [A][B] / (K_{mA}[B] + K_{mB}[A] + [A][B] + K_{iA}K_{mB})$$

で表され (Bisswanger, 2008)、式中の v は反応速度、 V_i は最大反応速度、 $[A]$ と $[B]$ は各基質、即ち11-シスレチノールとベンズアルデヒドの濃度、 K_{iA} は基質Aと酵素の結合定数、 K_{mA} と K_{mB} は各基質のミカエリス定数である。コンピュータプログラムを用いてフィッティングした結果、これらの変数を $V_i = 4.5$ amols 11-*cis* retinal formed/cone/sec、 $K_{iA} = 33$ μ M、 $K_{mA} = 126$ μ M、 $K_{mB} = 469$ μ M とすることで、測定値が理論式に対して良くフィットすることが確認された (図12A、実線)。このことから、AL-OL反応は逐次反応であると考えて矛盾のない結果となった。これらの数値で両逆数プロットにもフィッティングを行うと、当然ながら、直線群は一点で交差した (図12B、実線)。したがって、AL-OL反応は逐次的に進行すると結論した。

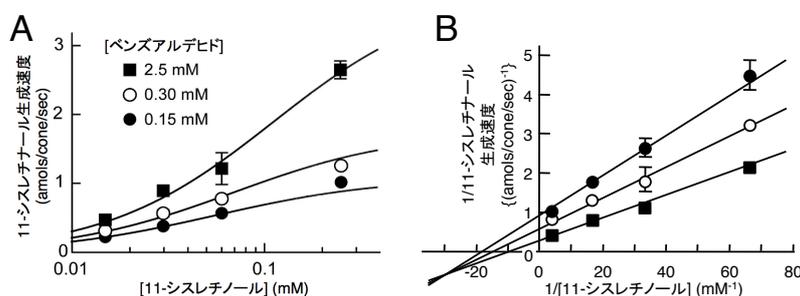


図12 反応機構の反応速度論的な解析 様々な濃度条件の11-シスレチノールとベンズアルデヒドにおけるAL-OL反応活性を測定した。活性は11-シスレチナル生成速度で評価した。(A-B) 3通りのベンズアルデヒド濃度における反応速度を11-シスレチノール濃度に対してプロットした結果を、逐次反応の理論式を使い、実数値で (A) また両逆数プロット (B) でフィッティングした (実線群、本文参照)。各データは平均値 \pm 2回の測定のばらつき ($n=2$) として表した。

脊椎動物では、AL-OL 反応のようにアルコールとアルデヒドを酸化還元共役させる反応の報告例はない。しかし細菌では、nicotinoprotein アルコール脱水素酵素 (np-ADH) などのある種のアルコール脱水素酵素が、その分子内に固く結合した補酵素 NAD (H) を利用して、アルコールの酸化反応とアルデヒドの還元反応を同時に触媒する事が報告されている (Schenkels and Duine, 2000) 。そこで、AL-OL 反応にも補酵素の関与があるのかどうか検討するため、NADP⁺、及び NADPH 存在下で AL-OL 反応活性を測定した。その結果、終濃度で 250 μM になるように NADP⁺、または NADPH を添加した錐体膜試料では、AL-OL 反応による 11-シスレチナール生成活性がほぼ 2.5 倍に上昇した (図 13) 。この結果から、AL-OL 反応の触媒機構に NADP (H) が関与する事が示唆された。

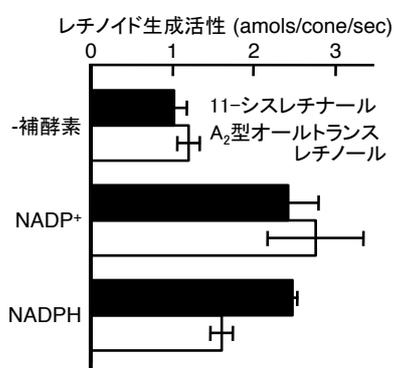


図13 補酵素NADP(H) 存在下で起こったAL-OL反応活性の上昇 11-シスレチノール (250 μM)、A₂型オールトランスレチノール (250 μM) とともにNADP⁺、またはNADPHを終濃度250 μMで加え、錐体膜とともに反応させた。対照実験として、NADP (H) を添加しない試料 (-補酵素) についても同時に測定した。データは平均値 ± 2回の測定のばらつきを表す。

錐体におけるAL-OL反応活性の細胞内局在

生体内におけるAL-OL反応の役割を理解する上で、コイ錐体におけるAL-OL反応活性の細胞内局在を知る事も重要である。そのためにまず、反応活性の膜局在について検討を行った。精製したコイの錐体を凍結融解操作によって破碎した後、遠心分離によって上清画分と沈殿画分に分離した。この際、活性は沈殿画分のみから検出された (データは示していない) 。さらに、同じ操作で得られた沈殿を様々な種類の緩衝液 (等張、高張、低張、界面活性剤入り緩衝液) に懸濁し、遠心分離によってその上清、及び沈殿画分を調製した。そして、得られた各画分のAL-OL反応活性を測定したところ、界面活性剤を含む緩衝液以外を使用した場合は活性が膜を含む沈殿画分のみから検出され、逆に界面活性剤を含む緩衝液を使用して膜を可溶化処理した場合は活性が主に上清画分から検出された (図14A) 。これらの結果から、AL-OL反応を触媒する酵素が錐体の膜に強く結合している事が示された。

次に、細胞分画法 (Fukagawa *et al.*, 未発表データ; 図6) による解析を行った。まず、精製コイ錐体 (外節と内節の両方を保持している; OS-plus-IS) に機械的な破碎処理を加えて外節と内節を分離した。次にその試料から、ショ糖不連続密度勾配法を用いて外節主要画分 (OS-rich) と内節主要画分 (IS-rich) を調製した。この操作において、錐体の水溶性タンパク質群が失われる事が予想されるが、AL-OL反応活性は強く膜に結合している (図14A) ため、その事が実験結果に与える影響は無視できると判断した。この操作で得られたOS-richは、分離操

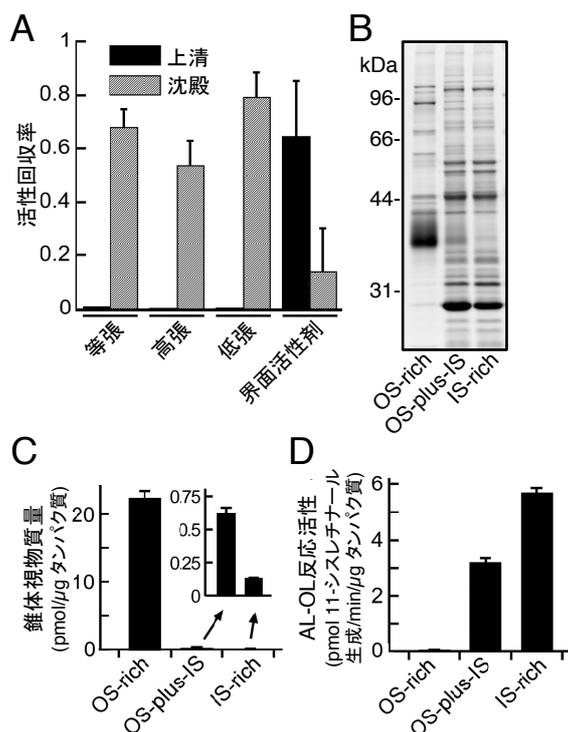


図14 錐体におけるAL-OL反応活性の細胞内局在 (A) 錐体膜に、等張(等張)、高張(高張)、低張(低張)緩衝液、及び0.48 mM ドデシル-β-D-マルトシドを含む緩衝液(界面活性剤)を用いて、遠心分離による洗浄操作を行い、得られた上清、及び沈殿画分のAL-OL反応活性を測定した。活性は出発材料の活性に対してノーマライズし、平均値 ± 標準偏差 (n=5、界面活性剤試料)、または平均値 ± 2回の測定のばらつき (n=2、界面活性剤以外の試料)として表した。(B-D) 外節主要画分(OS-rich)、内節主要画分(IS-rich)、及び出発材料の精製錐体(OS-plus-IS)のSDS-PAGE (B)、錐体視物質の含量(C)、及びAL-OL反応活性(D)。SDS-PAGE (B)では、各試料について総タンパク質2 μg分を測定した。また、錐体視物質の位置を★で示した。錐体視物質の含量(C)とAL-OL反応活性(D)は単位タンパク質量あたりの値にノーマライズし、平均値 ± 2回の測定のばらつき (n=2)で表した。

作前の試料(OS-plus-IS)と比べて、総タンパク質量に対する外節マーカー、錐体視物質量の割合が36倍に濃縮されていた(図14B、及びCのOS-richとOS-plus-ISの視物質量を比較)。その一方、IS-richでは大半のタンパク質は保持されているが、視物質の割合は顕著に減少していた(図14B、及びCのIS-richとOS-plus-ISの視物質、及び他のタンパク質の含量を比較)。OS-richとIS-richそれぞれのAL-OL反応活性を測定した結果、活性はIS-richのみから検出された(図14D)。本実験に用いた精製錐体試料を光学顕微鏡で観察した場合、大半の細胞は錐体視細胞で、観察される唯一の夾雑細胞は赤血球である。そこで、その夾雑の影響を評価するために、コイの血液から精製した赤血球のAL-OL反応活性を測定したところ、活性は全く検出されなかった(データは示していない)。また、視細胞に近接し、レチノイドの代謝に関わる事が知られている色素上皮からも、AL-OL反応活性が検出されないことが分かっている(Miyazono *et al.*, 2008)。従って、図14Dの結果はAL-OL反応活性を担う酵素が錐体内節に局在する事が強く示唆している。また、この実験に用いた精製錐体は細胞体やシナプス末端を失った状態で調製される(図2A)ので、AL-OL反応活性を担う酵素は内節のエリプソイド部分に局在していると考えられる。

考察

本研究ではまず、11-シスレチノールとオールトランスレチノールを錐体膜試料の存在下で反応させた際に生じる 11-シスレチナールとオールトランスレチノールが、11-シスレチノールの酸化反応と、オールトランスレチナールの還元反応によってそれぞれ生じる事を示し、異性化反応で生じるものではない事を示した(図9)。この結果と、反応の基質特異性に基づいて、反応の名称をアルデヒド-アルコール酸化還元共役反応に改めた(ただし略称はAL-OL反応のまま変えていない)。本研究ではAL-OL反応の基質特異性、基質結合機構、及び細胞内局在についても検討した。基質特異性の解析においては、アルデヒド還元反応がオールトランスレチナール以外にも様々なアルデヒドに対して幅広い反応性を示し、特に長い炭素鎖を持つアルデヒドに高い反応性を示すことが分かった(図10)。その一方、アルコール酸化反応は11-シスレチノールと9-シスレチノールに対して高い特異性を示すことが分かった(図11)。反応機構解析の結果からは、AL-OL反応が逐次反応であることが推測された(図12)。細胞内局在解析の結果からは、反応活性が錐体内節画分、おそらくエリプソイド部分の膜に局在する事が示された(図14)。これらの実験結果に基づき、反応触媒酵素の基質結合部位の構造と、AL-OL反応の機能メカニズムに関して議論したいと思う。

AL-OL反応を触媒する酵素が持つ基質結合部位の構造の推測

図12に示した通り、基質濃度とAL-OL反応活性の両逆数プロットは一点で交わっている。この結果から、AL-OL反応は逐次反応で、アルコール基質とアルデヒド基質の両方が触媒酵素に結合してから反応が進行すると考えられる。この反応機構から、触媒酵素はアルコール基質とアルデヒド基質に対してそれぞれ異なる結合部位を持つことが予想される(図15)。さらに、AL-OL反応はアルコール基質に関して、11-シスレチノールと9-シスレチノールに対する高い特異性を示した(図11)。対照的に、アルデヒド基質に関しては幅広いアルデヒドに対して反応性を示し、特に長い炭素鎖を持つものに対して高い反応性を示した(図10)。従って、これらの基質の結合部位はその特異性を反映する形を持つことが予想される(図15)。また、AL-OL反応では片方の基質が酸化され、もう片方の基質が還元される事から、反応中心はアルコール結合部位とアルデヒド結合部位の間にあると予想している。

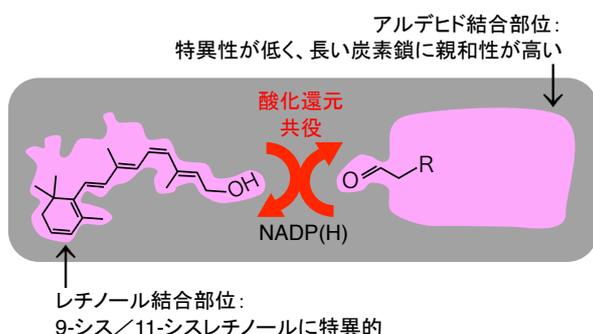


図15 AL-OL反応を触媒する酵素が持つ基質結合部位のモデル

AL-OL 反応の特徴として、補酵素の「添加」を必要とせず、アルコールの酸化とアルデヒドの還元を 1:1 の比で行う事がある。これには、NADPH のような高エネルギー代謝産物を必要としない、という利点がある。このような特徴を持つ反応は、脊椎動物では未知であるが、細菌では nicotinoprotein アルコール脱水素酵素 (np-ADH) などのある種のアルコール脱水素酵素が、自身に固く結合した NAD (H) を利用して、アルコールの酸化反応とアルデヒドの還元反応を同時に触媒すると報告されている (Schenkels and Duine, 2000)。ただし、np-ADH の触媒する反応はピンポン反応 (Schenkels and Duine, 2000) である。AL-OL 反応は逐次反応であると推測された (図 12) ことから、これら 2 つの反応の仕組みは完全には同じではないと考えられる。しかし、固く結合する補酵素を利用する、という点では似ている可能性がある。AL-OL 反応活性は補酵素 NADP (H) の添加で上昇した (図 13)。NADP⁺ と NADPH のどちらを加えた場合でも 11-シスレチナール生成活性は同程度上昇し、ほぼ同じ A₂ 型オールトランスレチナール生成活性も確認された。この結果から、錐体に発現する AL-OL 反応触媒酵素は np-ADH と同様に、自身に固く結合した NADP(H) を反応に利用すると予想している (図 15)。図 13 でみられた NADP(H) 添加による活性上昇は、NADP(H) 非結合型で存在していた錐体膜中の一部の触媒酵素が、添加した NADP(H) を結合したことに因るのではないかと考えている。

AL-OL反応の機能メカニズムの推測

先行研究 (Miyazono *et al.*, 2008) において、生体内での AL-OL 反応の基質はオールトランスレチナールと 11-シスレチナールだと予想されていた。前者は視物質の褪色に伴って生じる物質で、後者はミュラー細胞から錐体に輸送される物質である。実際に、視物質を褪色させた錐体膜試料に 11-シスレチナールを添加すると視物質が再生する、という現象が観測されている (Miyazono *et al.*, 2008)。この結果は、添加した 11-シスレチナールをアルコール基質、褪色させた視物質から生じたオールトランスレチナールをアルデヒド基質とする AL-OL 反応が起こって 11-シスレチナールが生成し、それが視物質を再生させた、と解釈することが出来る。このような反応が生体内の錐体でも起こるならば、錐体視物質の再生に関して 2 つの利点があると言える。1 点目は、錐体は NADP⁺ 依存的な 11-シスレチナール酸化活性より AL-OL 反応活性の方が 50 倍高い (Miyazono *et al.*, 2008) ため、視物質の再生を素早く行えること、2 点目は、AL-OL 反応が 11-シスレチナールと 9-シスレチナールに特異性を持つ (図 11) ため、反応が起こりさえすれば視物質の再生に寄与できること、である (11-シスレチナールと 9-シスレチナールのアルデヒド体はいずれも、オプシンと結合して感光性の視物質を再生する (Kefalov *et al.*, 2005) ので、視細胞において光を受容する機能を担うことができる)。

しかしながら、本研究において、AL-OL 反応活性が錐体の内節、おそらくエリプソイド部分に局在する事が示された (図 14)。このことから、以前の予想を修正する必要が生じた。それは、AL-OL 反応で生じた 11-シスレチナール内節から外節へ、視物質で生じたオールトランスレチナールが外節から内節へ、それぞれ輸送される必要がある (図 16)、という点である。一般的にアルデヒドは有毒な物質なので、ある種の細胞は細胞内でレチナールを輸送する細胞内レチナール結合タンパク質 (CRALBP) を発現しているが、視細胞にはそのようなタンパク質は発現していないと報告されている (Collery *et al.*, 2008)。しかし、以下に記すいくつかの証拠から、11-シスレチナールは錐体の細胞内で輸送され得ると考えられる。

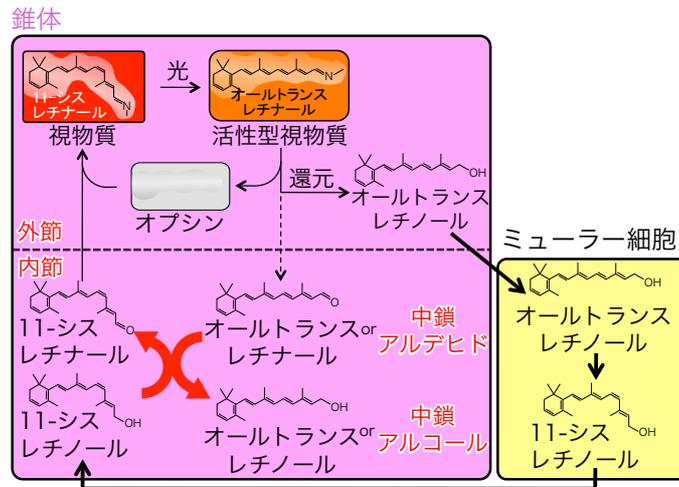


図 16 AL-OL 反応の機能メカニズムのモデル AL-OL 反応活性は視物質と異なり、内節に局在している。従って、ミュラー細胞から供給された 11-シスレチノールは、AL-OL 反応で 11-シスレチナールに酸化された後、何らかの仕組みで内節から外節へ輸送され、錐体視物質の再生に利用されると考えている。一方、11-シスレチナール生成反応のために利用するアルデヒド基質に関しては、先行研究 (Miyazono *et al.*, 2008) で想定された、視物質に由来するオールトランスレチナールというよりはむしろ、内節で生じた中鎖アルデヒドを利用するのではないかと考えている。

Jin ら (1994) は単離したサンショウウオの錐体に光を照射して視物質を褪色させた後、その細胞体 (内節の一部) に 11-シスレチナールを投与すると、それが外節に輸送され、視物質を再生させることを報告している。同論文では、この操作を桿体に対して行った場合は、視物質の再生はほとんど観測されないことも報告している。即ち、ここで報告された 11-シスレチナールの内節から外節への輸送は錐体特異的な現象である。さらに Wang ら (2011) はサンショウウオ、マウス、サル、ヒトの単離網膜において、錐体と内節部分で近接し、11-シスレチノールを錐体に供給すると考えられているミュラー細胞を薬剤処理により選択的に破壊すると、錐体視物質の再生が起こらなくなることを報告している。このことは、ミュラー細胞から錐体内節に供給された 11-シスレチノールが、錐体内節で AL-OL 反応によって 11-シスレチナールに酸化された後、錐体外節へと輸送される、と仮定することでうまく説明できる。これらのことから、錐体には 11-シスレチナールを内節から外節へ輸送する特別な仕組みが備わっていることが予想される。しかし、その分子機構はまだ分かっていない。そこで、本論文ではその分子機構について、錐体オプシンが関与する新たな作業仮説を提案する。錐体視物質の発色団 11-シスレチナールは、外から加えた 9-シスレチナールと交換される事が報告されている (Matsumoto and Yoshizawa, 1975)。また、錐体の細胞内 11 シスレチナール濃度は低いいため、暗所においても約 10 %の赤錐体オプシンが 11-シスレチナールを遊離していることが報告されている (Kefalov *et al.*, 2005)。このように、11-シスレチナールとオプシンの結合が不安定であることは、様々なサブタイプの錐体視物質に共通の性質であり (Kefalov *et al.*, 2005)、この不安定な結合が錐体中での 11-シスレチナールの輸送に関与すると考えることができる。新たに提案する輸送の作業仮説は、錐体オプシンが輸送の中継地点として機能し、11-シスレチナ

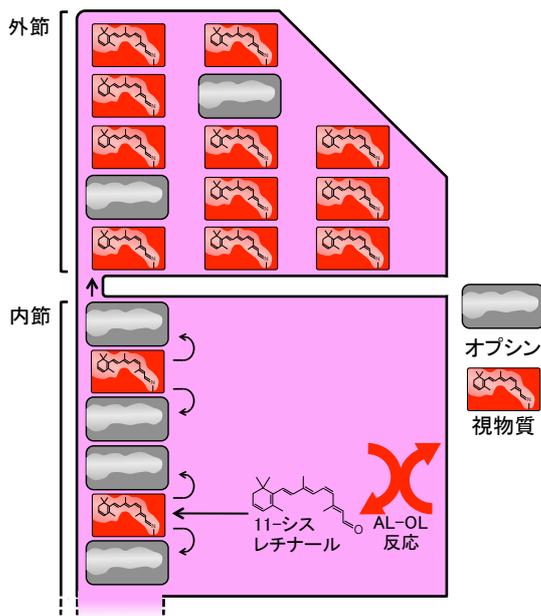


図 17 錐体内節から外節への 11-シスレチナル輸送機構のモデル 本モデルでは、AL-OL 反応によって錐体内節に生じた 11-シスレチナルはまず、内節に存在する錐体オプシンに結合する。この錐体オプシンは絶えず内節で新たに合成され、外節へと輸送され続けている。錐体オプシンと 11-シスレチナルの間の結合は不安定なので、11-シスレチナルは遊離し、隣接するオプシンと再度結合する。この解離と再結合を繰り返しながら、最終的に 11-シスレチナルは外節に達し、視物質の発色団として機能する。

ールをあるオプシンから隣のオプシンへとリレーすることによって、全体として 11-シスレチナルが内節から外節へと移動していく、というものである (図 17)。オプシンは内節で合成され、常に外節へと輸送され続けている。従って、オプシンが中継地点として働くならば、11-シスレチナルの外節への輸送経路は常に存在することになる。勿論、錐体には未知のレチナル結合タンパク質群が発現しており、それがアルデヒドの輸送体として働く、という可能性も考えられる。

次に、外節から内節へのオールトランスレチナルの輸送についても考えてみる。桿体では、大半の視物質が褪色した場合、それに伴って生じたオールトランスレチナルが外節から内節に漏れる事が報告されている (Chen *et al.*, 2012)。桿体の外節と比べ、錐体の外節は高いオールトランスレチナル還元活性を持つ (Miyazono *et al.*, 2008; Ala-Laurila *et al.*, 2006; Maeda *et al.*, 2005) ため、外節からの内節へのオールトランスレチナルの漏れは起こりにくい事が予想されるが、もし起こっていれば、それは内節で起こる AL-OL 反応に対するアルデヒド供給経路になるだろう (図 16 点線)。AL-OL 反応におけるもう一つのアルデヒド供給源として、エリプソイド部分にあるミトコンドリア (図 2A) が考えられる。図 10 で、中鎖アルデヒドのヘキサナルとノナナルが、AL-OL 反応の基質としてオールトランスレチナルと同等、あるいはそれ以上の効率で働く事を示した。これらの中鎖アルデヒドは、ラット肝臓由来の単離ミトコンドリアを酸化ストレス条件に晒した際に生じることが報告されている (Reinheckel *et al.*, 1998)。もし、これらのアルデヒドが、通常の状態の錐体ミトコンドリアでも生じるならば、生体内で AL-OL 反応の基質として働くことが考えられる (図 16)。

今後の見通し

AL-OL 反応はコイ錐体の内節に特異的に存在し、11-シスレチノールから 11-シスレチナールを高い効率で生成する反応である。本研究でその興味深い反応特性の一部が明らかになったが、この反応が錐体の光受容に対してどのように寄与するのか、特に錐体内節で生成すると考えられる 11-シスレチナールがどのように錐体外節に送られるのかについて理解するには、さらなる研究が必要であると考えている。

第二章 AL-OL反応の触媒酵素、コイRDH13Lの同定と機能解析

序論

AL-OL反応を担う分子について、先行研究 (Miyazono *et al.*, 2008) の時点ではコイ錐体の膜に局在すること、60 °Cで5 分間熱処理を行うと失活することが分かっていたが、それ以外のことはほとんど分かっていなかった。また、レチナールとレチノールの酸化還元共役反応についての報告はこれまでになく、より一般化して、アルコールとアルデヒドの酸化還元共役反応について調べた場合でも、脊椎動物では報告がなく、バクテリアに関して先述のnp-ADHなどによる酵素反応 (Schenkels and Duine, 2000) が数例報告されているだけであった。そこで、本研究ではAL-OL反応を担う分子は新規のものだろうと考え、それを同定しようと考えた。

まず、第一章に記した実験結果から目的の分子は膜タンパク質であると考え、その分子をコイ錐体から単離する条件を検討した。その結果、単離はできなかったものの、目的のタンパク質を部分精製することができた。さらに、その部分精製試料に含まれるタンパク質から、精製操作時の溶出プロファイルがAL-OL反応活性の溶出プロファイルと良く似ていたものを選別することで、目的タンパク質の有力な候補であるコイRDH13Lを同定した。そこで、コイRDH13Lを昆虫培養細胞Sf9で発現させ、そのAL-OL反応活性を測定した結果、活性が検出され、コイRDH13LがAL-OL反応触媒酵素であることが示された。また、コイ錐体に発現することが既知であるRDH8、RDH8L2、及びRDH13についても同様の測定を行ったところ、コイRDH13からは活性が検出され、RDH8、RDH8L2からは検出されなかった。コイRDH13Lに関してさらに、その特性を第一章に記したコイ錐体のもの比較したところ、細胞内局在は一致したものの、基質特異性と反応活性の絶対値の2点で不一致が認められた。これらのことから、コイRDH13Lは錐体でAL-OL反応を触媒する酵素であるが、反応の全てを担うものではないことが推測された。また、AL-OL反応へのNADP⁺またはNADPH (以降、NADP(H)と表記する) の関与が推測されたので、発現精製したコイRDH13L-His6に含まれるNADP(H)を定量した結果、使用したコイRDH13L-His6の44 ± 7 %に相当する量のNADP(H)が検出され、そのほとんどはNADP⁺だった。この結果から、コイRDH13LがNADP(H)を強く結合する性質を持つことが示唆された。

本章では、AL-OL反応がコイだけではなく哺乳動物にも存在するのか、ということも検討した。その結果、コイRDH13Lと似たアミノ酸配列を持つマウスの4つのタンパク質、RDH11、RDH12、RDH13、及びRDH14のうち、RDH14のみがAL-OL反応活性を持つことが示された。マウスRDH14はAL-OL反応活性に加えて、NADP⁺依存的な11-シスレチノール酸化活性を合わせ持つ事も示された。マウスRDH14が持つこれら両方の反応活性について、それぞれの温度依存性を検討した結果、15 °C、25 °CではAL-OL反応活性が優位であったが、37 °Cにおいては両反応活性の差はほとんどなかった。これら両方の反応活性と、その特徴的な温度依存性は、発現コイRDH13L、及び、コイ錐体膜試料でも同様に観察された。

これらの結果を踏まえて、本章の考察ではAL-OL反応の分子メカニズムと、コイとマウスの錐体での11-シスレチナール生合成の仕組みについて議論する。

実験方法

AL-OL反応触媒酵素の部分精製と同定

第一章に示した方法で精製コイ錐体から調製した内節主要画分を膜洗浄用緩衝液（10 mM HEPES-水酸化ナトリウム、1 mM DTT、pH 7.5）で、遠心分離によって1回洗浄処理した後、次の操作まで、-80 °Cで保存した。合計コイ45匹、 3.7×10^7 個の錐体から調製した膜試料をまとめて1.03 mlの可溶化処理用緩衝液（9.6 mM DDM、10 mM HEPES-水酸化ナトリウム、1 mM DTT、pH 7.5）に懸濁した後、回転混合器で可溶化処理（4 °C、30 min）した。可溶化処理後の試料を遠心分離（100,000 × g、4 °C、20 min）して上清（錐体内節可溶化試料）を回収した。錐体内節可溶化試料のうち1 mlを、微量タンパク質分画装置AKTAmicro（GEヘルスケア）に装着し、予め平衡化用緩衝液（0.19 mM DDM、10 mM HEPES-水酸化ナトリウム、1 mM DTT、pH 7.5）で平衡化しておいた陰イオン交換カラムMono Q PC 1.6/5（GEヘルスケア）にロードし、平衡化用緩衝液を流して素通り画分（Mono Q素通り画分）を1.5 ml回収した。Mono Q素通り画分のうち1.48 mlを限外濾過装置spin-X UF 500 30k MWCO（CORNING）で20倍に濃縮して75 µlにした後、80 % (w/v) グリセロール水溶液 25 µlを添加した。この試料を全量、分取電気泳動装置NATIVEN S（ATTO）を用いて、high resolution clear native electrophoresis法（hrCNE法；Wittig *et al.*, 2007）を一部改変した方法（改変hrCNE法）で分画した。具体的には、まずNATIVEN Sの説明書に記載された操作で、改変hrCNE用のポリアクリルアミドゲル（25 mM イミダゾール-塩酸、6 % (w/v) アクリルアミド、0.19 mM DDM、pH 7.0）を、装置に付属のガラス筒内に作製した。固化した後のゲルは、その両端を超純水で約1秒すすいで未重合のアクリルアミドを洗浄した後、ゲル内部のアクリルアミドを完全に重合させるために4 °Cで1晩静置した。この際ゲルは、乾燥を防ぐ目的で、超純水で湿らせたキムワイプとともにラップで包んだ。次に、同説明書に記載された操作で分取電気泳動を行った。この泳動では、陰極側（上部槽）の泳動用緩衝液に50 mM トリシン、7.5 mM イミダゾール、0.19 mM DDM、0.16 mM デオキシコール酸ナトリウム（pH 7.0）を、陽極側（下部槽）用の泳動用緩衝液に25 mM イミダゾール-塩酸（pH 7.0）を、回収用緩衝液に25 mM イミダゾール-塩酸、5 % (w/v) スクロース、0.19 mM DDM（pH 7.0）を、それぞれ使用した。また、NATIVEN Sの出力電流値の設定は1 mA、作動時間の設定はそれぞれ回収待機時間（delay）108 min、泳動通電時間（EP）4 min、分取回収時間（collect）120 sec、回収溶液充填時間（fill）24 sec、とし、分画本数の設定は48 cycles、ゲルサイズの設定はSmallとした。得られた画分の中でAL-OL反応活性を持つもの（活性画分）を決定するため、各画分の一部を分取し、後述の方法で活性測定を行った。ここで決定した活性画分を部分精製試料とした。部分精製試料のうち575 µlは限外濾過装置で約20倍に濃縮し、30 µlにした後、含まれるタンパク質をSDS-PAGE法で分離し、銀染色MSキット（Wako）を用いて染色した。染色されたタンパク質の一部は、大阪大学大学院医学系研究科附属共同研究実習センター（共同研）のタンパク質受託解析サービス（ゲルバンド解析）を利用してマスマスペクトル解析により同定した。

共同研では、タンパク質をトリプシンで消化して得られたペプチドを、質量分析装置SYNAPT G2（Waters）を用いたLC-MS/MS法で分析して頂いた。さらに、検索プログラムMascot（Matrix Science）を用いて、分析で得られたマスマスペクトルデータに対応するタンパク質を、

ゼブラフィッシュ (*Danio Rerio*) のプロテオームデータベース (IPI_zebrafish_386) から検索して頂いた。なお、ここでコイではなくゼブラフィッシュのデータベースを用いたのは、コイのデータベースがまだ整備されていないためである。この方法で、部分精製試料に含まれる 37 kDa タンパク質の主要成分としてゼブラフィッシュのレチノール脱水素酵素様タンパク質 (retinol dehydrogenase-like) が同定された。このタンパク質のコイオルソログは、コードする cDNA 配列が既に部分的に決定されており、RDH13L と名付けられていた (Miyazono、博士学位論文、2008)。そこで、後述の方法でコイ RDH13L のコード領域全長に対応する cDNA の塩基配列を決定し、全アミノ酸配列を決定した後、その配列に対応するマスペクトルが 37 kDa タンパク質から得られていたデータの中にあるかどうか、共同研に解析を依頼した。

部分精製過程にある試料の AL-OL 反応活性測定

内節主要画分の反応活性測定では膜洗浄用緩衝液で 100 μ l に懸濁した試料を用いた。錐体内節可溶化試料、及び Mono Q 素通り画分の活性測定では、これらの試料を DDM 濃度が 1.9 mM に、体積が 50 μ l になるように膜洗浄用緩衝液で希釈した後、等量のグリセロール入り緩衝液 (40 % (w/v) グリセロール、10 mM HEPES-水酸化ナトリウム、1 mM DTT、pH 7.5) と混合して用いた。改変 hrCNE 法で得られた画分は、回収用緩衝液で 50 μ l に希釈した後、等量のグリセロール入り緩衝液と混合して用いた。特に、錐体内節可溶化試料、及び Mono Q 素通り画分の活性測定で用いた緩衝液組成については、簡便で、かつ、高い活性が得られるように条件検討した結果である。

これらの試料の AL-OL 反応活性の測定は、第一章に実験方法として記した「AL-OL 反応活性の測定」に沿って行った。ただし、反応の基質には 11-シスレチノール (250 μ M) とベンズアルデヒド (5 mM) を用い、反応時間は 1 時間とした。操作を簡便にするため、基質のどちらか片方を加えない対照実験は省略し、AL-OL 反応活性の値は反応後の試料から検出された 11-シスレチナールの量 (pmol) と定義した。

コイ RDH13L のクローニング

コイ RDH13L は ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene) を使用して作製されたコイ網膜 cDNA ライブラリー (Matsukawa *et al.*, 2005) からクローニングした。コイ RDH13L コード領域の部分配列は既に分かっていた (Miyazono、未発表データ)。そこで、そのコード領域全体の配列を決定するために、既知の部分配列に対応するプライマー (表 3) と、cDNA ライブラリー作製用ベクター (pBluescript SK(-)) の cDNA 挿入部位近傍の塩基配列に対応するプライマーを使用した PCR 法で、コイ網膜 cDNA ライブラリーを鋳型に、コイ RDH13L をコードする cDNA の 5' 末端側、3' 末端側をそれぞれ増幅した。ただし、3' 末端側の cDNA は通常の PCR 法で増幅されなかったため、nested PCR 法で増幅した。増幅された DNA は TA クローニング法で pGEM-T easy (Promega) に挿入した後、大腸菌に導入した。得られた大腸菌の単コロニーを鋳型用の試料に用いた PCR 法で、pGEM-T easy に挿入された配列を増幅し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit と PRISM 3130 Genetic Analyzer (ともに Applied Biosystems) を用いてその DNA 配列を決定した。決定された配列から、コイ RDH13L の 5' UTR 領域、3' UTR 領域それぞれに対応するプライマー、及びコイ RDH13L コード領域の 5' 末端、3' 末端それぞれに対応す

るプライマー（表3）を設計した。コイ網膜cDNAライブラリーを鋳型として、これらのプライマーを使用したnested PCR法でコイRDH13Lコード領域を増幅した。増幅されたDNAはTAクローニング法でpGEM-T easy（Promega）に挿入した。こうして得られたプラスミドDNAをpGEM-T easy-cRDH13Lとして以降のリクローニング操作等に用いた。

表3 cDNA クローニングや発現ベクター作製に使用したプライマーの DNA 配列 各プライマー組はそれぞれ、増幅したい DNA の 5'末端に結合するものを上に、3'末端に結合するものを下に示した。*¹ユニバーサルプライマー、T3。*²ユニバーサルプライマー、M13-20。*³ユニバーサルプライマー、T7。その他のプライマーは本研究で独自に設計した。

遺伝子名	用途	塩基配列
コイRDH13L	cDNAの5'末端側配列決定	5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGG-3' * ¹ 5'-GGCACATCATTATCCCAGCATT-3'
	cDNAの3'末端側配列決定 (nested PCRの一段階目)	5'-GGAGTGGAAATGGCAACGTGGTTGTGAAGA-3' 5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3' * ²
	cDNAの3'末端側配列決定 (nested PCRの二段階目)	5'-GCTCTGGCCAAAGATATACAGCAGACTGAA-3' 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' * ³
	pGEM-T easy-cRDH13Lの作製 (nested PCRの一段階目)	5'-TGGACTGTCACAACACTACACAGTTAC-3' 5'-GCAGATTTGGAATGTACACAGGAA-3'
	pGEM-T easy-cRDH13Lの作製 (nested PCRの二段階目)	5'-TTGGATCCATGCAGGACTACACAAAGGCA-3' 5'-TTGAATTCTCAAGCCAGGCCACCAT-3'
	pGEM-T easy-cRDH13L-His6の作製	5'-TTGGATCCATGCAGGACTACACAAAGGCA-3' 5'-TCAGTGATGGTGATGGTGATGAGCCAGGCCACCAT-3'
	pGEX-5X-1へ挿入するcDNAの増幅	5'-CATGAATTCATGCAGGACTACACA-3' 5'-CATGTCGACTCAAGCCAGGCCAC-3'
マウスRDH11	pGEX-5X-1へ挿入するcDNAの増幅	5'-CATGAATTCATGTTTCGGATTCTCTGCTTCTGCTCTCT-3' 5'-CATGTCGACTTACCAATCCACTGGGAGGCCAGCA-3'
マウス RDH12	pGEX-5X-1へ挿入するcDNAの増幅	5'-CATGAATTCATGCTGTTTATCTTGGTACTGCTTACG-3' 5'-CATGTCGACCTATTCCCCTGGATTCTAGAAAGCT-3'
マウス RDH13	pGEX-5X-1へ挿入するcDNAの増幅	5'-CATGAATTCATGAGCCGCTTCTGCTGCCGGTGT-3' 5'-CATGTCGACTTATCTGGGAATGGCATGTCCTCT-3'
マウス RDH14	pGEX-5X-1へ挿入するcDNAの増幅	5'-CATGAATTCATGGCAGTGGCTAGTGTGGCCGCA-3' 5'-CATGTCGACCTATTTTAGAATGCCAACCATCACTT-3'

タンパク質発現用ベクターの調製

RDHを昆虫培養細胞Sf9で発現させるために、発現用バキュロウイルスを調製した。後述のバクミドへのトランスポジション操作に用いるpFastBac1ベクター（invitrogen）は、コイのRDH8（BAG72429）、RDH8L2（BAG72430）、及びRDH13（BAG72431）のものに関しては宮園貞治博士から提供して頂いた。コイRDH13L、及びコイRDH13L-His6用のpFastBac1ベクターは、下記の方法で調製した。まず、His6タグをコードする配列を付加したプライマー（表3）を用いたPCR法で、pGEM-T easy-cRDH13Lを鋳型に、コイRDH13L-His6をコードするDNAを増幅し、TAクローニング法でpGEM-T easyに挿入した。こうして得られたプラスミドDNAをpGEM-T easy-cRDH13L-His6として次のリクローニング操作に用いた。pGEM-T

easy-cRDH13L、及びpGEM-T easy-cRDH13L-His6をBamHIとEcoRIで処理してコイRDH13L、コイRDH13L-His6をコードするDNAをそれぞれ調製し、pFastBac1のBamHI認識配列とEcoRI認識配列の間に挿入した。こうして得られたそれぞれのpFastBac1ベクターから、Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (invitrogen) を用いて発現用バキュロウィルスを調製した。以下の発現ウィルス調製操作は、基本的には同キットの説明書に従って行った。

まず、それぞれのpFastbac1は、その内部に挿入された、RDHをコードするDNAをバキュロウィルスシャトルベクターのバクミドにトランスポジションさせるため、トランスポジション用の大腸菌コンピテントセルDH10Bac (invitrogen) に導入した。導入後の大腸菌は、トランスポジションが起こったものだけが白色のコロニーとして増殖できる選択用LB寒天培地 (50 µg/ml カナマイシン、7 µg/ml ゲンタマイシン、10 µg/ml テトラサイクリン、40 µg/ml IPTG、300 µg/ml X-galを含む) で培養した。生じた白色コロニー内のバクミドについて、PCR法でトランスポジションが起こった事を確認した後、ミニプレップ法で増幅、精製した。得られたバクミドはまず、Cellfectin Reagent (invitrogen) を用いて、35 mm径の培養皿に播いた約 5×10^5 個のSf9に導入した。次いで、形質転換後のSf9を抗生物質入りの培地 (100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを添加したSf-900 II SFM (Intitrogen)) で3日間27 °Cで培養した後、バキュロウィルスを含む培養上清を回収した。次に、ウィルスを増幅するため、別の35 mm径の培養皿に播いた約 5×10^5 個のSf9を、回収した培養上清 500 µlで処理してバキュロウィルスに感染させ、抗生物質入りの培地で4日間27 °Cで培養した後、培養上清を回収した。最後に、ここで得られた培養上清1 mlと10 cm径培養皿に播いた約 5×10^6 個のSf9を用いて、同様のウィルス増幅操作をもう一度行った。そして、得られた培養上清を発現用バキュロウィルス溶液として、後の操作に用いた。

いくつかのRDHはN末端GST融合RDH (GST-RDH) としても発現させた。その発現ベクターを作製するため、それぞれのRDHをコードするDNAを表3の各プライマーを用いたPCR法で増幅した。PCR反応の鋳型に用いたDNAはRDHのサブタイプ毎にそれぞれ異なり、コイRDH13LについてはpGEM-T easy-cRDH13Lを、マウスRDH11 (NP_067532)、マウスRDH12 (NP_084293)、及びマウスRDH14 (NP_076186) についてはP0齢マウス網膜のcDNAライブラリー (大阪大学蛋白質研究所の古川貴久教授に提供して頂いた) を、マウスRDH13 (NP_780581) についてはDNAFORMから購入したcDNAクローン (FAMTOMクローン、ID: 4432411I09) を、それぞれ用いた。増幅されたDNAは、N末端GST融合タンパク質発現用ベクターpGEX-5X-1 (GE ヘルスケア) のEcoRI認識配列とSalI認識配列の間に挿入した。なお、本研究で用いたマウスRDH11、RDH12、及びRDH13は、アメリカの国立生物工学情報センター (NCBI) の運営するタンパク質データベース (Protein) においては、各RDHの前駆体 (precursor) として登録されていて、成熟体は別に登録されている。しかし、コイRDH13Lのアミノ酸配列により似た配列を持っているのが前駆体の方であることや、RDH11、RDH12についてはP0齢マウス網膜のcDNAライブラリーからクローニングされたのが前駆体の方だった (RDH13については、前駆体と成熟体のどちらもクローニングできなかった) ことから、本研究ではそれらを用いた。

Sf9を用いたRDHの発現と細胞分画によるSf9膜試料の調製

10 cm径の培養皿に播いた約 5×10^6 個のSf9を、4倍希釈した発現用バキュロウイルス溶液1 mlで処理した後、抗生物質入りの培地で3日間25 °Cで培養した。培養後のSf9はスクレイパーで培養皿から剥がし、3.6 mlの氷冷リン酸緩衝液 (PBS; 137 mM 塩化ナトリウム、2.7 mM 塩化カリウム、10 mM リン酸水素二ナトリウム、2 mM リン酸二水素カリウム) に懸濁した後、遠心分離 ($1,600 \times g$, 4 °C, 10 min) して、上清を除去した。得られた細胞の沈殿はSf9分画用緩衝液 (10 mM HEPES-水酸化ナトリウム、333 mM スクロース、1 mM DTT、1 % (v/v) プロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク)) で3.6 mlに懸濁した後、細胞を破碎するために氷上でガラステフロンホモジナイザーを用いて10ストローク処理した。破碎後の試料から比較的比重の高い成分を除去するために遠心分離 ($200 \times g$, 4 °C, 10 min) を行い、上清を回収した。ここで得られた沈殿をSf9分画用緩衝液で3.6 mlに懸濁したものから、もう一度同様の操作で上清を回収した。これら2回の遠心で回収した上清は、両方とも遠心分離 ($10,000 \times g$, 4 °C, 10 min) して上清を除去した。得られた発現RDHを含む沈殿は、1% (v/v) プロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク)を添加したグルコン酸カリウム緩衝液で450 μ lに懸濁した後、-80 °Cで必要時まで保管した。凍結した試料を融解し、グルコン酸カリウム緩衝液を用いて3回、遠心分離 ($100,000 \times g$, 4 °Cで15 min) による洗浄処理を行った。ここで得られた試料をRDH発現Sf9膜試料として、後の実験に用いた。RDH発現Sf9膜試料に含まれるRDHの量は、試料の分注に含まれるRDHをSDS-PAGE法で分離した後、CBBで染色し、その染色強度を既知量のBSAと比較することで見積もった。この見積もりに対する、Sf9内在性タンパク質の影響を差し引くために、空のバキュロウイルスを感染させたSf9から調製した同等の対照試料も調製し、RDHの染色強度から、対照試料での相当部位の染色強度を差し引く補正も行った。RDH発現Sf9膜試料をAL-OL反応活性の測定に用いる場合は、RDH 濃度が0.1-0.2 μ Mになるように、グルコン酸カリウム緩衝液 (100 μ l) で希釈して使用した。

コイRDH13L-His6の精製

コイRDH13L-His6は、固定化金属アフィニティー担体Ni-NTA Agarose (QIAGEN) を用いたアフィニティー精製法で精製した。まず、 1×10^7 個のSf9から調製したコイRDH13L-His6発現Sf9膜試料を遠心分離 ($100,000 \times g$, 4 °C, 15 min) して、上清を除去した。得られた沈殿を吸着処理用緩衝液 (10 mM イミダゾール、20 mM トリス-塩酸、300 mM 塩化ナトリウム、10 % (w/v) グリセロール、pH8.0) で900 μ lに懸濁した後、200 mM DDM水溶液を100 μ l添加し、回転混合器で可溶化処理 (4 °C, 30 min) を行った。可溶化処理後の試料は遠心分離 ($100,000 \times g$, 4 °C, 15 min) して上清を回収し、予め同じ組成の緩衝液で平衡化しておいたNi-NTA Agarose 80 μ lに添加した。試料中のRDH13L-His6をNi-NTA Agaroseに吸着させるために、この試料を回転混合器で処理 (4 °C, 60 min) した。吸着処理の後、試料を遠心分離 ($1,890 \times g$, 室温, 5 sec) し、上清を除去した。残ったNi-NTA Agaroseは洗浄用緩衝液 (0.19 mM DDM, 25 mM イミダゾール, 20 mM トリス-塩酸, 300 mM 塩化ナトリウム, 10 % (w/v) グリセロール, pH8.0) 900 μ lを用いて、遠心分離 ($1,890 \times g$, 室温, 5 sec) による洗浄操作を2回行った。最後に、洗浄操作後のNi-NTA Agaroseに溶出用緩衝液 (0.19 mM DDM, 500 mM イミダゾール, 20 mM トリス-塩酸, 300 mM 塩化ナトリウム, 10 % (w/v) グ

リセロール、pH8.0) 370 μ lを添加し、約10回反転混合した後、遠心分離 (1,890 \times g、室温、5 sec) を行い、上清を回収した。この操作は合計8回行った。得られた上清は、PD-10カラム (GEヘルスケア) を用いて溶媒をMono Q平衡化用緩衝液に置換した後、使用時まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。これを精製コイRDH13L-His6溶液として活性測定、及びNADP(H)の定量に使用した。コイRDH13L-His6の量、及び純度の評価は、この試料の分注に含まれるタンパク質群をSDS-PAGE法で分離し、CBBで染色した後、既知量のBSAと染色強度を比較して定量することで行った。精製コイRDH13L-His6をAL-OL反応活性の測定に用いる場合は、RDH濃度が0.2 μ M、容積が50 μ lになるようMono Q平衡化用緩衝液で希釈した後、グリセロール入り緩衝液 50 μ lと混合して使用した。

コイRDH13L-His6に含まれるNADP(H)の定量

NADP(H)の定量は、Schenkels and Duine (2000) の方法を一部改変した方法で行った。精製コイRDH13L-His6溶液に等量の10 M尿素水溶液を加え、変性処理を行った。この変性処理後の試料を直接、微量分析機SMART system (Pharmacia) に装着した陰イオン交換カラムMono Q PC 1.6/5にロードして分析した。分析用の移動相には10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) を用い、KClの濃度を直線的に0 mMから400 mMに上昇させることでMono Qに吸着したNADP(H)を溶出させた。溶出したNADP(H)は、溶出液の260 nmと340 nmにおける吸光度をモニターすることで検出した。試料に含まれるNADP⁺、またはNADPHの量は、それぞれの物質に対応するクロマトグラム上のピークの面積を、既知量の標準NADP⁺、またはNADPH (KOHJIN) から得られたピークの面積と比較することで行った。これらの標準NADP⁺、またはNADPHは、変性処理後のコイRDH13L-His6と同じ組成の緩衝液に溶解してから分析した。

N末端GST融合RDH (GST-RDH) の発現と精製

発現させる各RDHのコード領域を挿入したpGEX-5X-1を発現用大腸菌 (BL21株) に導入した。導入された大腸菌は、37 $^{\circ}$ Cの液体培地で対数増殖期まで増殖させた後、その培養容器を25 $^{\circ}$ Cの水に約5分間浸けて冷却し、発現を誘導するためにイソプロピル- β -チオガラクトピラノシドを終濃度0.1 mMで添加した後、25 $^{\circ}$ Cでさらに10 時間培養した。培養した大腸菌は遠心分離 (3,300 \times g、25 $^{\circ}$ C、5 min) で沈殿させて回収し、上清は除去した。得られた大腸菌の沈殿は使用した培地の1/25-1/10容の大腸菌懸濁用緩衝液 (1 % (v/v) Triton X-100、及び1 % (v/v) プロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク) を添加したPBS) で懸濁した。大腸菌を破碎するため、得られた懸濁液に10秒間の超音波処理 (超音波処理機UD-200 (TOMY) 、強度4) を4回行った。試料の発熱を抑えるため、超音波処理は常に氷水で試料を冷却しながら行い、処理の各回の間隔は1分間ずつとった。超音波処理後の試料は遠心分離 (40,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 min) した後、GST-RDHを含む上清を回収した。GST-RDHはGlutathione-Sepharose (GEヘルスケア) を用いて、同製品の説明書に記載されたアフィニティー精製法 (クロマトグラフィー法、またはバッチ法) に沿って行った (詳細は省略する)。抗血清作製用にGST-コイRDH13Lを大量調製 (発現用の大腸菌を400 mlの液体培地で培養) した際はカラムクロマトグラフィー法を、活性測定用にGST-RDHを少量調製 (同25 ml) した際にはバッチ法を、それぞれ用いた。いずれの精製法でも、Glutathione-Sepharoseの平衡化、及び洗浄処理には1% (v/v) Triton X-100

を添加したPBSを、GST-RDHの溶出には50 mM 還元型グルタチオンを含む50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.1) を、それぞれ用いた。得られた精製GST-RDH溶液の溶媒は、抗血清作製に用いる場合はPD-10カラムを用いてPBSに、活性測定に用いる場合はZeba Desalt Spin Columns (Thermo Fisher Scientific) を用いて膜洗浄用緩衝液に、それぞれ置換した。

抗GST-コイRDH13L血清と精製コイRDH13L抗体の調製

抗GST-コイRDH13L血清はマウスを用いて作製した。まず、PBSで0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度になるように希釈したGST-コイRDH13L 1 mlを等量のフロイント完全アジュバントと完全に混和させた後、5週齢のマウス6匹の腹腔内に200 μl ずつ注射し、初回免疫を行った。2週間後、PBSで0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度になるように希釈したGST-コイRDH13L 0.9 mlを等量のフロイント不完全アジュバントと完全に混和させた後、同様の注射をして追加免疫を行った。さらに9日後、各マウスから全採血を行い、37 °Cで1時間、4 °Cで8時間、それぞれ静置した後、遠心分離 (10,000 $\times g$, 4 °C, 10 min) を行い、その上清を血清として回収した。得られた血清のコイRDH13Lに対する反応性、及び特異性は、イミュノプロット法でコイの発現RDH8、RDH8L2、RDH13、RDH13Lに対する血清の反応性を確認することで検討した。このとき、コイRDH13Lに対する反応性と特異性が両方、十分に高いと判断した血清だけを抗GST-コイRDH13L血清として以降の操作に用いた。

抗GST-コイRDH13L血清は、コイのRDH8、RDH8L2、及びRDH13には反応性を示さなかったが、精製コイ錐体に含まれるコイRDH13L以外のタンパク質に対して反応性を示した。そのため、この抗血清は錐体の免疫細胞染色に使用することはできなかった。そこで免疫細胞染色用に、コイRDH13Lに特異的に反応する抗体を抗GST-コイRDH13L血清からアフィニティー精製した。まず、コイRDH13L-His6を吸着したポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜片を以下の方法で調製した。14 μM コイRDH13L-His6溶液 50 μl をSDS変性処理溶液 (0.16 % (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム、100 mM トリス-塩酸、154 mM 塩化ナトリウム、pH7.5) 80 μl と混合した。この試料に、イミュノプロット用緩衝液 (192 mM グリシン、25 mM トリス、0.1 % (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム、20 % (v/v) メタノール) で予め湿らせた10枚のPVDF膜片 (2.5 \times 5 mm角) を入れ、室温で5分間反応させ、コイRDH13L-His6をPVDF膜片に吸着させた。PVDF膜片をプラスチックの角形容器 (4.8 \times 7.2 \times 1.3 cm) に回収し、10 mlのTBS (100 mM トリス-塩酸、154 mM 塩化ナトリウム、pH 7.5) 中で5分間振盪して洗浄した。この操作は、TBSを交換して合計3回行った。次に、コイRDH13L-His6を吸着したPVDF膜片を1.7 mlプラスチックチューブに入れ、TBS 400 μl で希釈した抗GST-RDH13L血清100 μl を添加した。これを回転混合器で処理 (4 °C、1日) し、血清中のRDH13L抗体をPVDF膜上のRDH13Lと結合させた。結合処理後のPVDF膜片はプラスチックの角形容器に回収し、10 mlのTBS中で5分間振盪して洗浄した。この操作は、TBSを交換して合計5回行った。洗浄後のPVDF膜片は全て1本の1.7 mlプラスチックチューブに移し、ピペットマンを用いてできる限りTBSを除去した後、酸性緩衝液 (200 mM グリシン-塩酸、pH 2.0) を50 μl 加え、氷上で10分間反応させて抗体を溶出させた。反応中、酸性緩衝液がPVDF膜全体に行き渡るように、2分間に1回程度、ピペッティングしてPVDF膜を洗った。反応後の緩衝液は0.6 mlプラスチックチューブに回収した後、即座に1 M トリス水溶液 11.3 μl と混合して酸を中和した。この試料を精製コイRDH13L抗体として4 °Cで保

存した。この抗体は、コイRDH13Lには反応するが、精製コイ錐体に含まれるコイRDH13L以外のタンパク質に対しては反応しないことが確認されたので、錐体の免疫細胞染色に使用した。また、その免疫染色において対照実験で使用したコントロール溶液は、マウス正常血清に対して同様の抗体精製操作を行うことで調製した。

錐体に発現するRDH13Lの定量

精製コイ錐体を凍結融解で破碎した後、グルコン酸カリウム緩衝液に懸濁して遠心 ($100,000 \times g$, 15 min, 4°C) を行い、上清は回収し、沈殿はグルコン酸カリウム緩衝液に懸濁した。 2.0×10^5 個の錐体から調製した上清、及び沈殿に含まれるコイRDH13Lを、TBSで100倍希釈した抗GST-コイRDH13L血清を用いて、一般的なイミュノブロット法（方法の詳細は省略する）で定量した。この際、定量用の標準試料には既知量のRDH13L-His6を、二次抗体にはTBSで5000倍希釈したPeroxidase-Labeled Affinity Purified Antibody To Mouse IgG (KPL) を、シグナルの検出には化学発光試薬ケミルミワン（ナカライテスク）と撮影システムImageQuant LAS 4000mini（GE ヘルスケア）を用いた。

単離した錐体の免疫細胞染色

錐体の免疫細胞染色はArinobuら（2010）に記載された方法を一部改変して行った。まず、赤外線照明下の完全暗室内において、暗視スコープ下で観察しながら、コイの網膜をリンガー液（119.9 mM 塩化ナトリウム、2.6 mM 塩化カリウム、0.5 mM 塩化カルシウム、0.5 mM 塩化マグネシウム、0.5 mM 硫酸マグネシウム、1 mM 炭酸水素ナトリウム、0.5 mM リン酸二水素ナトリウム、16 mM グルコース、4 mM HEPES-水酸化ナトリウム、pH 7.5）中に取り出し、絵筆で叩くことで視細胞懸濁液を調製した。コイ15匹から調製した約15 mlの視細胞懸濁液は、94 μm ナイロンメッシュフィルターに通して大きな組織片を除去した後、300 μl を分注し、8 % (w/v) パラホルムアルデヒド (PFA) を加えたリンガー液 300 μl と混合し、氷上で1時間静置した。この試料を、90 % (w/v) パーコールを含むリンガー液 800 μl と、45 % (w/v)、及び30 % (w/v) パーコールと4 % (w/v) PFAを含むリンガー液各800 μl から構成される不連続密度勾配に重層した後、遠心分離 ($33,000 \times g$, 4°C , 20 min) した。次いで、45 %と90 %の境界面付近から細胞懸濁液 600 μl を回収し、4 % (w/v) PFAを含むリンガー液 1400 μl で希釈した後、遠心 ($600 \times g$ で12 sec, $2400 \times g$ で3 sec) で細胞を沈殿させ、パーコールを含む上清を除去した。回収した細胞は4 % (w/v) PFAを含むリンガー液150 μl で2回洗浄してパーコールをさらに除去した後、固定処理のために同じ溶液の中で静置 (4°C , 12 時間) した。これ以降の操作は通常白色照明下で行った。固定した細胞はMASコートスライドガラス (MATSUNAMI) 上に静置 (25°C , 15 分) して、接着させた。接着させた細胞はPBSで3回洗浄した後、細胞膜の透過処理を行うため、1 % (v/v) Triton X-100を添加したPBSと反応させた (室温, 15 分)。透過処理後の細胞はPBSで3回洗浄した後、乾燥処理を行うため、室温のデシケーターに一晩静置した。乾燥処理後の細胞はブロッキング処理のため、1.5 % (v/v) ヤギ正常血清、及び0.2 % (v/v) Triton X-100を添加したPBSと反応させた (室温, 1 時間)。ブロッキング処理後の細胞はPBSで3回洗浄した後、一次抗体溶液 (表4) と 4°C で一晩反応させた。一次抗体と反応させた後の細胞はPBSで1回洗浄した後、二次抗体溶液と室温で1 時間反応

させた。この操作で用いた二次抗体溶液は、Alexa488で標識された抗マウスIgG抗体とAlexa568で標識された抗ウサギIgG抗体（ともにMolecular Probes）を混合し、PBSで330倍に希釈したものである。二次抗体処理後の細胞はPBSで3回洗浄した後、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI（Vector Laboratories）とともにカバーガラスで封入し、光学顕微鏡で観察した。

表4 免疫細胞染色の一次抗体処理に使用した抗血清、および抗体 コイ錐体オプシン抗体、及び抗血清は決定された各コイ錐体オプシンのアミノ酸配列を元に、部分ペプチドに対して作成された（河村、未発表）。特異性の低いものについては、抗原ペプチドを用いてアフィニティー精製されている。コイ錐体オプシンのアミノ酸配列は以下の ID で登録されている。赤オプシン（BAB32496）、緑オプシン1と2（BAC76806、BAC76807）、青オプシン（BAC78822）、UV オプシン（BAC78823）。TOM20 抗体は SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY から購入した（商品番号：sc-11415）。

名称	希釈倍率	抗原	免疫動物
コイRDH13L抗体	5	GST-コイRDH13L	マウス
コントロール溶液	5	無し	マウス
赤/緑オプシン抗体	1000	ペプチド(CSTSKTEVSSVAPA)	ウサギ
抗青オプシン血清	2000	ペプチド(CKQIPEFHEDF)	ウサギ
UVオプシン抗体	2000	ペプチド(CG YAEDTNKDYR)	ウサギ
TOM20抗体	300	ヒトTOM20	ウサギ

結果

AL-OL反応触媒酵素コイRDH13Lの部分精製と同定

AL-OL反応触媒酵素を同定するため、その酵素を精製コイ錐体から単離することを試みた (図18A、B)。この酵素活性は錐体内節の膜にあるので (第一章)、まず、コイ錐体から内節主要画分を調製した (図18A、B; IS-rich)。次いで、この膜試料にDDMで可溶化処理を行い、遠心分離によって可溶性画分 (図18A、B; DDM) を回収し、陰イオン交換カラムMono Qにロードして、カラムを素通りしたタンパク質を回収した (図18A、B; Mono Q)。最後に、回収したタンパク質を限外濾過装置で濃縮した後、分取電気泳動 (Native-PAGEの変法、改変hrCNE法; 方法の項参照) で分画した。この操作で得られた画分の中からAL-OL反応活性を示す画分 (図18A、B; Native-PAGE) を決定し、これを部分精製試料とした。出発材料の内節主要画分と比較して、部分精製試料へのAL-OL反応活性の回収率は1.5 %で、その精製度は4.2倍であった (図18B)。

次に、部分精製試料に含まれるタンパク質の中から、AL-OL反応活性を担う候補タンパク質を検討した。図19は、先述の部分精製の過程において、分取電気泳動で得られた各画分のAL-OL反応活性と、各画分に含まれるタンパク質をSDS-PAGEで分離した結果の比較である。SDS-PAGEで分離されたタンパク質群の中で、37kDaタンパク質 (矢頭) は各画分における存在量がAL-OL反応活性と比較的良好な相関を示した。そこで、このタンパク質をAL-OL反応活性を担うタンパク質の候補として、さらに解析することにした。

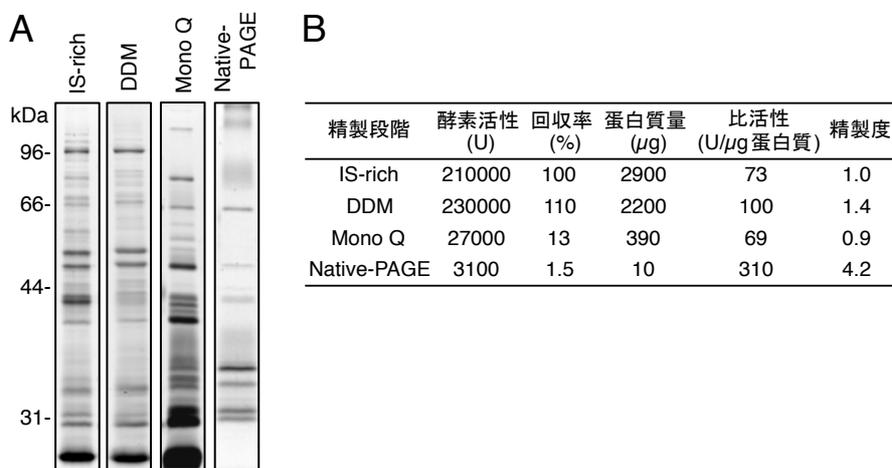


図18 AL-OL反応触媒酵素の部分精製と同定 (A-B)部分精製の結果。各段階における試料のSDS-PAGEの結果(A)と精製表(B)を示した。各試料の名称と精製操作段階の対応は本文を参照されたい。SDS-PAGE (A)に使用した試料の量は任意である。精製表(B)における単位酵素活性(U)は、試料に11-シスレチノール(250 μM)とベンズアルデヒド(5 mM)を1時間反応させた際に生成する11-シスレチノールの量(pmol)と定義した。また、回収率は各精製段階における酵素活性の値を、精製度は各精製段階における活性値を総タンパク質量で除して求めた比活性を、それぞれIS-richでの値に対してノーマライズして算出した。

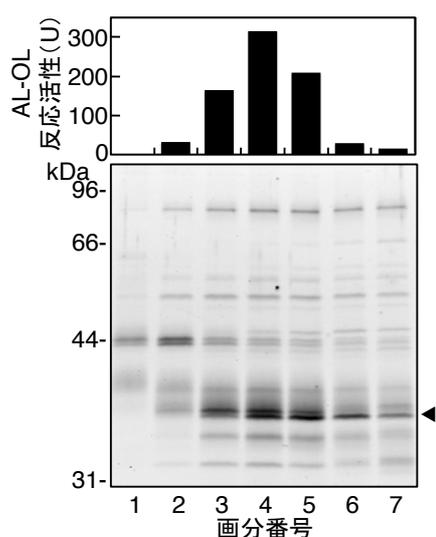


図19 改良hrCNE法で得られた各画分のAL-OL反応活性(上)と、それぞれの画分に含まれるタンパク質をSDS-PAGEで分離した結果(下)の比較。矢頭で示した37 kDaタンパク質(下)は、その存在量がAL-OL反応活性(上)と良い相関を示した。

表5 37 kDaタンパク質の候補として挙げられたタンパク質。図19の37 kDaタンパク質をLC-MS/MSで分析し、得られたマススペクトルデータに対応するタンパク質をゼブラフィッシュのプロテオームデータベースから検索した結果(上2行)と、同じデータをコイ RDH13Lのアミノ酸配列に対して照合した際の結果(下1行)。検出されたペプチドの種類は、それぞれのタンパク質がトリプシンで完全消化されたと想定した場合に生じる各ペプチド断片のうち、本測定で検出されたものの数を、アミノ酸配列カバー率は、各タンパク質のアミノ酸配列全長の中で、検出されたペプチドでカバーされる領域の割合を、計算分子量は、各タンパク質のアミノ酸配列のみから想定される分子量を、それぞれ示す。

蛋白質	生物種	検出されたペプチドの種類	アミノ酸配列カバー率(%)	計算分子量(kDa)
retinol dehydrogenase-like	ゼブラフィッシュ	3	9.8	37
voltage-dependent anion channel 3		2	7.4	30
RDH13L	コイ	8	26	36

SDS-PAGEで分離した37 kDaタンパク質をトリプシンで消化し、得られたペプチドのマススペクトルをLC-MS/MS法で測定した後、測定されたマススペクトルデータに対応するタンパク質を、検索プログラムMascotを用いて、プロテオームデータベースから検索した。ただし、同定に必要なプロテオームデータベースは、本研究で実験動物に用いたコイについて整備されていなかった。しかし、データベースの整備が進んでいる、コイに比較的近縁な種の生物としてゼブラフィッシュがいた。そこで、目的タンパク質のゼブラフィッシュオルソログが同定できる事を期待して、ゼブラフィッシュのデータベースから検索を行った。その結果、37 kDaタンパク質(図19、矢頭)の候補として、ゼブラフィッシュのretinol dehydrogenase-likeとvoltage-dependent anion channel 3が挙げられた(表5)。2つの候補のうちretinol dehydrogenase-likeは計算分子量が37 kDaで、SDS-PAGEの移動度から見積もられた分子量とほぼ一致していた。

ゼブラフィッシュretinol dehydrogenase-likeに関して、ウェブ上の各種公共データベースでの記述を調査したところ、このタンパク質は過去に機能解析された事はないが、そのアミ

ノ酸配列上の特徴から、レチノイドの酸化還元に関わるレチノール脱水素酵素 (RDH) という酵素ファミリーに属することが予想されていた。このことから、retinol dehydrogenase-likeはAL-OL反応を触媒する酵素の候補として有力であると判断した。

そこで、37 kDaタンパク質の主要成分と予想されるretinol dehydrogenase-likeのコイオルソログを同定することにした。文献調査の結果、そのコイオルソログは先行研究 (Miyazono, 博士学位論文、2008) においてRDH13Lと名付けられ、コードするcDNAは既に部分的にクローニングされていたことが分かった。そこでその配列情報をもとに、コイ網膜cDNAライブラリーからRDH13Lのコード領域全長をクローニングして、そのアミノ酸配列を決定した (図20)。決定した配列を37 kDaタンパク質から得られたマスペクトルデータと照合したところ、コイRDH13Lの8つの部分ペプチドのアミノ酸配列と一致するデータが見つかり、それらのペプチドは合わせてコイRDH13L全長の26%をカバーしていた (表5、図20 色付きの帯)。この結果から、37 kDaタンパク質の主要成分がコイRDH13Lであることが強く示唆された。

精製コイRDH13L-His6のAL-OL反応活性測定

部分精製試料から同定されたコイRDH13LがAL-OL反応活性を持つかどうか検討するために、精製コイRDH13L-His6を調製し、そのAL-OL反応活性を測定した。コイRDH13L-His6

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
ATGCAGGACTACAAAGGCAGTGAAGTGTGGTGGAAAGAATCATCTCGAGGGGTCCACCGTGTCTGGTGACAGGTGTCGGGCTCTTTGCTCCGGAGATGGCTGGGGGAGTC
M Q D Y T K A V K V F V E E H P A G V T A V L V T G V G L F A L R R W L A G G V

130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
TGCCGACGCAAGCAGCTTGGACGGCAAACTGTTCTGATAACGGGAGCCAACCCGGTATCGGCAAGAGACAGCGGTGGACATGGCCAACAGAGGTGCAAGGGTCATCTGGCTTGC
C R S K A R L D G K T V L I T G A N T G I G K E T A V D M A N R G A R V I L A C

250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
CGAGACATGGCCAGACCAACAAGCAGCAGATGAGGTGAGAAAGAGGAGTGGAAATGGCAACGTGGTTGGAAGATGCTGGATCTGGCCTCCTTGCAGTCTGCCAGCTCGGCCAAA
R D M G R A N K A A D E V R K R S G N G N V V V K M L D L A S L Q S V R A L A K

370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
GATATACAGCAGACTGAAGAGAGACTGGATGTTCTCATTAAATAGCTGGGATAATGATGTGCCACAGTGAAGACAGATGATGGCTTTGAGATGCAAGTTGGTGTGAACATCTGGGT
D I Q Q T E R L D V L I N N A G I M M C P Q W K T D D G F E M Q F G V N H L G

490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
CATTTCTGCTTACCAACTTACTTCTGGACTTGTGGAAGAAATCAACACCCAGCGGTGTTGTCAATGTTCCAGCCTGGCCCATGAGAAAAGGCAAGATTCTTTGATGATATAAACCCTG
H F L L T N L L L D L L K K S T P S R V V N V S S L A H E K G K I H F D D I N L

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
GAGAAAACTATGATCCAAGTTATCGACAGAGCAAGCTGGCCAATGTTCTTACCCGGGAAGTACTGCTGAGACTGAAAGGCACAGGAGTGCAACCTACGCTTTCATCCT
E K N Y D P T I S Y R Q S K L A N V L F T R E L A V R L K G T G V T T Y A L H P

730     740     750     760     770     780     790     800     810     820     830     840
GGGGTATCCATACAGAGCTGGCCGACACTTTCCCTCTTTGCTCTTTGGAAGAGGCTTTGTTTCATGCCCTTTTCTTTGTCAAAACACCTTGGCAGGGTGGCAGACCACC
G V I H T E L G R H F L P S L P L W K R L L F M P F F F V V K T P W Q G A Q T T

850     860     870     880     890     900     910     920     930     940     950     960
ATCTACTGCGCAGTGGATGAGAGTCTGCAGAATACAGCGGACTTTACTACAGTGATTGTGCCCAAGAGGCAGCTCCTCAGGGTAGAGATGATGCTGAGCCCGCAGACTGTGGGAT
I Y C A V D E S L Q N T S G L Y Y S D C A P K E A A P Q G R D D A A A R R L W D

970     980     990
CTCAGTGCTTCCATGGTGGCCTGGCTTGA
L S A S M V G L A *

```

図20 コイRDH13LをコードするcDNAの塩基配列とそれがコードするアミノ酸配列 上から、コード領域開始塩基からの塩基数を示す数字、cDNAの塩基配列、アミノ酸配列をそれぞれ示す。各項目についてcDNA120塩基長毎に改行した。各アミノ酸は対応する各コドンの左端の位置に、一文字表記で示した。また、色付きの帯で強調して示したアミノ酸配列は、図18Aの37kDaタンパク質をトリプシンで消化し、得られたペプチドをLC-MS/MS法で分析した際に検出された8本のペプチドに対応する。

は Sf9 のタンパク質発現系を用いて発現し、固定化金属イオンアフィニティー担体 Ni-NTA Agarose を用いて精製した。SDS-PAGE 法で分析した結果、得られた精製コイ RDH13L-His6 の純度は 99 % と見積もられた (図 21A)。次に、この精製コイ RDH13L-His6 の AL-OL 反応活性を測定した。基質として 11-シスレチノール (250 μ M) と A₂型オールトランスレチナール (250 μ M) の両者を加えて反応させた結果、それぞれの酸化、還元反応産物 (11-シスレチナールと A₂型オールトランスレチノール) がほぼ 1:1 の比で、 0.13 ± 0.03 (/RDH 分子/sec) の速度で生じた (図 21B)。この結果から、コイ RDH13L が AL-OL 反応活性を持つことが示された。

コイ錐体に発現する RDH13L、RDH8、RDH8L2、及び RDH13 の AL-OL 反応活性測定

コイの錐体には RDH13L の他に、RDH8、RDH8L2、及び RDH13 が発現することが分かっている (Miyazono *et al.*, 2008)。そこで、これらの各サブタイプの RDH の AL-OL 反応への寄与を検討するために、Sf9 のタンパク質発現系を用いてコイの RDH13L、RDH 8、RDH8L2、及び RDH13 をそれぞれ発現し、得られた発現 Sf9 膜試料の AL-OL 反応活性を測定した (図 22)。その結果、コイ RDH13L とともに、コイ RDH13 から有意な活性を検出した。一方、コイ RDH8、及びコイ RDH8L2 からはほとんど活性が検出されなかった。活性の大きさはそれぞれ、コイ RDH13L が 0.015 ± 0.008 (/RDH 分子/sec)、コイ RDH13 が 0.0074 ± 0.0027 (/RDH 分子/sec) であった。

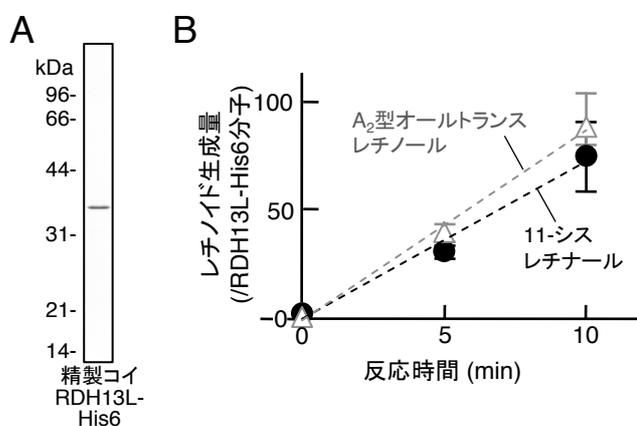


図21 精製コイ RDH13L-His6 の AL-OL 反応活性 精製コイ RDH13L-His6 の SDS-PAGE (A) と AL-OL 反応活性測定 (B)。SDS-PAGE (A) には 0.17 μ g (4.6 pmol) の精製コイ RDH13L-His6 を使用した。反応活性測定 (B) では、0.1 μ M の精製コイ RDH13L-His6 溶液 100 μ l に 11-シスレチノール (250 μ M) と A₂型オールトランスレチナール (250 μ M) の両者を加えた。2種類の反応生成物の生成量の時間経過をそれぞれ直線でフィッティングし (B、点線)、その傾きの平均値から反応速度 (0.13 ± 0.03 /RDH 分子/sec) を求めた。データは平均値 \pm 2回の測定のばらつきを表す (n=2)。

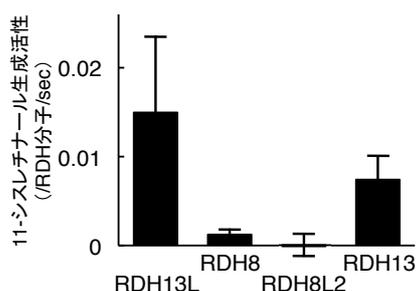


図 22 コイの錐体に発現する各 RDH サブタイプの AL-OL 反応活性 0.2 μ M の RDH を含む発現 Sf9 膜試料 100 μ l に対して、11-シスレチノール (250 μ M) と A₂型オールトランスレチナール (250 μ M) の両者を反応させ、生成した 11-シスレチナールを定量した。グラフには、その量から見積もった 11-シスレチナール生成活性 (/RDH 分子/sec) を示した。データは平均値 \pm 2回の測定のばらつきを表す (n=2)。

コイ錐体におけるRDH13Lの発現量と細胞内局在

コイ錐体が持つAL-OL反応活性に対するRDH13Lの寄与の大きさを見積もるために、精製コイ錐体に含まれるRDH13Lの量をイミュノブロット法で定量した。イミュノブロットに用いた抗血清はマウスをGST-コイRDH13Lで免疫して調製した。得られた抗血清の反応性、及び特異性は予めコイのRDH8、RDH8L2、RDH13、及びRDH13Lを用いて検討し、RDH13Lに特異的に反応することを確認した(図23A)。既知量のコイRDH13L-His6を標準試料に、精製コイ錐体から調製した沈殿、上清各画分に含まれるRDH13Lの量をイミュノブロット法で定量した結果、RDH13Lは沈殿画分のみから検出され、コイ錐体一つあたりのRDH13L発現量は $139万 \pm 32万$ 分子 ($n=3$ 、平均値 \pm 標準偏差) と見積もられた(図23B-D)。この値に、コイRDH13L-His6の一分子当たりのAL-OL反応活性(図21B、 $0.13/RDH$ 分子/sec)をかけることで、コイ錐体におけるRDH13Lの活性を見積もると、 0.31 ± 0.07 (amols/cone/sec) と見積もられた(図23D、RDH13L)。一方、定量に用いた精製コイ錐体沈殿画分のAL-OL反応活性は、 1.4 ± 0.3 (amols/cone/sec、平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$) (図23D、コイ錐体)であった。この結果から、コイ錐体の持つAL-OL反応活性に対するコイRDH13Lの寄与の大きさは $22 \pm 5\%$ と見積もられた(図23D)。

図14では、細胞分画法によってAL-OL反応活性がコイ錐体の内節部分に局在することを示した。この結果をコイRDH13Lの細胞内局在と比較するために、単離したコイ錐体におけるRDH13Lの局在を免疫細胞染色法で観察した(図24)。染色に用いたコイRDH13L抗体は予め、

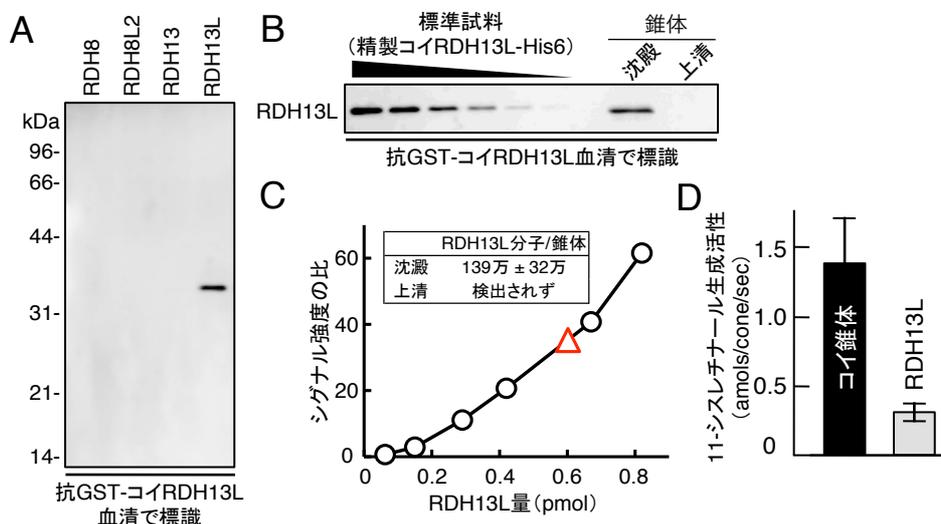


図23 コイ錐体のRDH13L発現量とAL-OL反応活性に対するRDH13Lの寄与 (A) イミュノブロット法で、抗GST-RDH13L抗血清をコイのRDH8、RDH8L2、RDH13、またはRDH13Lを0.4 pmol含む各Sf9膜試料それぞれに反応させ、RDH13Lに対する特異性を確認した。(B-C) イミュノブロット法で20万個の精製コイ錐体から調製した沈殿、上清画分に含まれるコイRDH13Lを定量した際の化学発光像(B)と検量線(C)の一例。定量用の標準試料には既知量の精製コイRDH13L-His6を用いた。また、(C)には3回の実験結果から見積もった精製コイ錐体一つあたりのRDH13L発現量(平均値 \pm 標準偏差)も示した。(D) 定量に用いた錐体沈殿画分のAL-OL反応活性(コイ錐体)と、コイ錐体に発現するRDH13LのAL-OL反応活性の見積もり値(RDH13L)を比較した。平均値 \pm 標準偏差 ($n=3$) で示した。

精製コイ錐体に発現するタンパク質群の中で、RDH13L に対して特異的に反応する事を免疫ブロット法で確認した (図 24A)。免疫細胞染色の結果、RDH13L のシグナルは錐体外節マーカーの赤/緑オプシン、青オプシン、UV オプシンの各シグナルとは全く重ならない (図 24C、E、G) が、内節マーカーの TOM20 のシグナルとはほぼ一致すること (図 24I) が確認された。また、マウス正常血清から調製したコントロール溶液で処理した錐体からは、有意なシグナルが検出されなかった (図 24K)。この結果から、コイ RDH13L は錐体の内節部分に局在することが示された。さらに、精製コイ錐体から細胞分画法で外節主要画分、内節主要画分をそれぞれ調製し (図 14B、C)、それらの画分に含まれるコイ RDH13L を免疫ブロット法で検出した実験でも同様に、内節部分への局在を示す結果が得られた (図 24L)。これらの結果から、コイ錐体における RDH13L の細胞内局在は、AL-OL 反応活性の局在と一致することが示された。また、コイ RDH13L は波長感受性の異なる全てのタイプの錐体に発現することも示された。

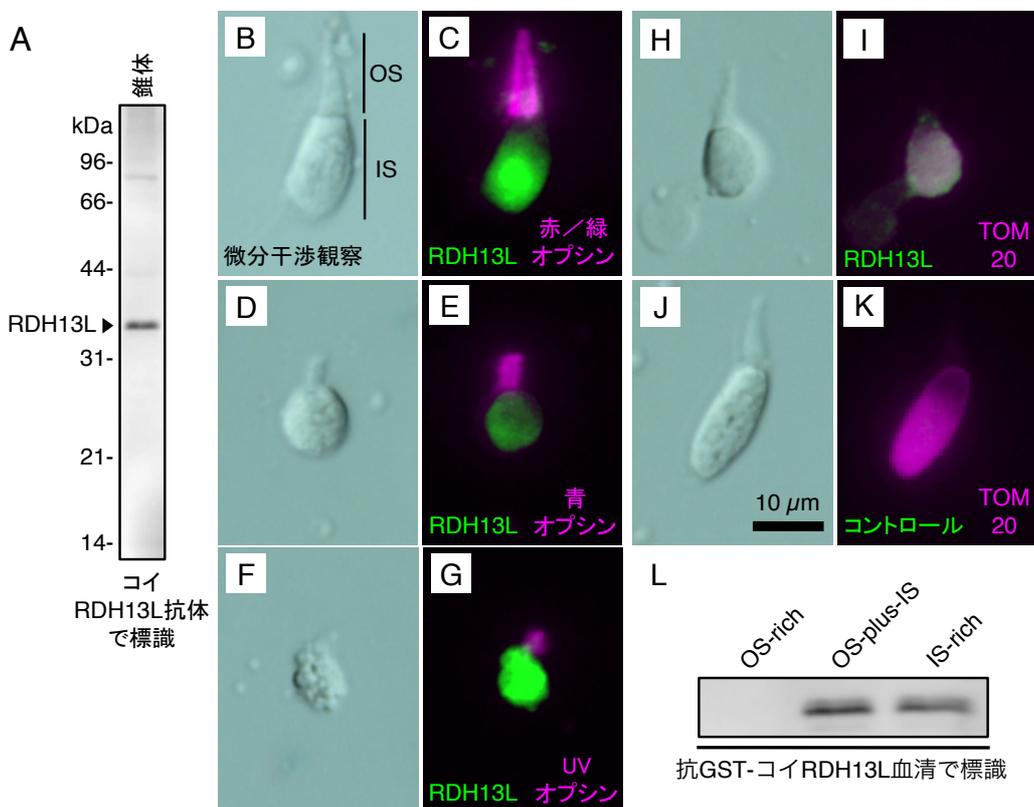


図 24 コイ錐体における RDH13L の細胞内局在 (A) イミュノブロット法で、精製コイ錐体 12 万個から調製した試料にコイ RDH13L 抗体を反応させ、この抗体のコイ RDH13L (矢頭) に対する特異性を確認した。(B-K) 単離したコイ錐体に対して免疫細胞染色を行った際の微分干渉観察 (B、D、F、H、J) とマージした蛍光染色像 (C、E、G、I、K)。蛍光染色像には、各細胞の免疫染色に使用した抗体、あるいは抗血清の略称を付記した。ただし、コントロール (K) はマウス正常血清から調製したコントロール溶液を用いて染色操作を行ったことを示す。RDH13L の局在を解析するために、各オプシンを外節マーカー、TOM20 を内節マーカーとして扱った。(L) 分画操作前の精製コイ錐体 16 万個相当 (OS-plus-IS) と、同じ数の錐体から細胞分画法で調製した外節主要画分 (OS-rich) と内節主要画分 (IS-rich) それぞれに含まれる RDH13L を、抗 GST-コイ RDH13L 血清を用いた免疫ブロット法で検出した際の化学発光像。

コイRDH13Lの基質特異性

コイ錐体が持つAL-OL反応活性に対するコイRDH13Lの寄与をさらに検討するために、コイ錐体とRDH13Lの基質特異性を比較した。コイRDH13Lの基質特異性はコイ錐体と同じ方法（各種アルデヒド：図10、レチノール異性体：図11A）で検討し、図25に対応するコイ錐体での結果（図10、図11A）と比較して示した。RDH13Lの測定用試料には、コイ錐体と同じ膜懸濁液の試料が好ましいと考え、コイRDH13Lを発現したSf9膜試料を用いた。まず、6種類のアルデヒド基質について検討した結果、コイRDH13Lは、幅広い種類の疎水性アルデヒドに対して反応性を示し、ドデカナルやノナナルなど、比較的長い炭素鎖を持つアルデヒドに強い反応性を示した（図25A）。この結果をコイ錐体のもの（図25B）と比較すると、3-メチル-2-ブテナールに対する反応性の有無や、各アルデヒドを使用した際の11-シスレチナール生成量の比について違いが認められた。次に、レチノール基質について検討した結果、11-シスレチノール、9-シスレチノール、及びオールトランスレチノールに対しては有意な反応性が見られ、13-シスレチノールには反応性を示さなかった（図25C）。これについてもコイ錐体のもの（図25D）と比較したところ、オールトランスレチノールに対する反応性の有無と、9-シスレチノールに対する活性の大きさについて違いが認められた。

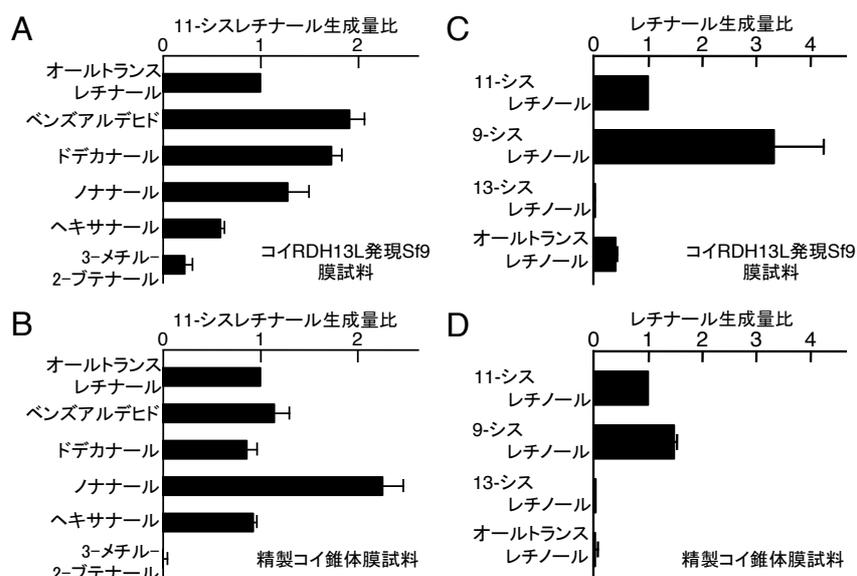


図 25 コイ RDH13L と精製コイ錐体の基質特異性の比較 コイ RDH13L の各アルデヒド基質 (A)、各レチノール基質 (C) に対する反応性を検討し、それぞれ精製コイ錐体のもの (B、D) と並べて示した。アルデヒド (A) については、0.1 μM コイ RDH13L を含む発現 Sf9 膜試料 100 μl に 11-シスレチノール (250 μM) と各アルデヒド (250 μM) を加えて反応させ、生成した 11-シスレチナールを定量した。グラフには、その量をオールトランスレチナールでの量に対してノーマライズしたデータを示した。アルコール (B) については、0.2 μM コイ RDH13L を含む発現 Sf9 膜試料 100 μl にベンズアルデヒド (5 mM) と各レチノール立体異性体 (250 μM) を加えて反応させ、各レチノール異性体が酸化されて生じたレチナールを定量した。グラフには、その量を 11-シスレチノールでの量に対してノーマライズしたデータを示した。精製コイ錐体のグラフ (B、D) はそれぞれ図 10、図 11A のデータをもとに、比較対象となる RDH13L のデータと同様のノーマライズを行って作成した。データは平均値 \pm 標準偏差 (n=3)、または平均値 \pm 2 回の測定のばらつき (n=2)。

精製コイRDH13L-His6への補酵素NADP⁺の結合

コイRDH13Lのアミノ酸配列を、NCBIの提供するドメイン検索プログラム (CD-search) で解析すると、コイRDH13LはNADP(H)結合サイトを持つことが予想された。また、コイ錐体にNADP⁺、あるいはNADPHを添加すると、そのAL-OL反応活性が2.5倍に上昇した (図13) ことから、AL-OL反応にはNADP(H)が関与することが示唆されていた。しかし、精製コイRDH13L-His6は、補酵素を添加しない条件でもAL-OL反応活性を示した (図21B)。これらのことから、精製コイRDH13L-His6は、その分子内にNADP(H)を強く結合していると予想し、精製コイRDH13L-His6に含まれるNADP(H)の定量を試みた。

まず、NADP(H)を解離させるために、精製コイRDH13L-His6を尿素で処理して変性させた。次いで、変性処理後の試料を陰イオン交換カラムMono Qで分析し、コイRDH13L-His6に含まれるNADP⁺、及びNADPHを定量した (図26)。その結果、試料からはほぼNADP⁺のみが検出され、その検出モル数は、分析に使用した精製コイRDH13L-His6モル数の43 ± 6 % (n=3、平均値 ± 標準偏差) に相当する量であった (図26E)。

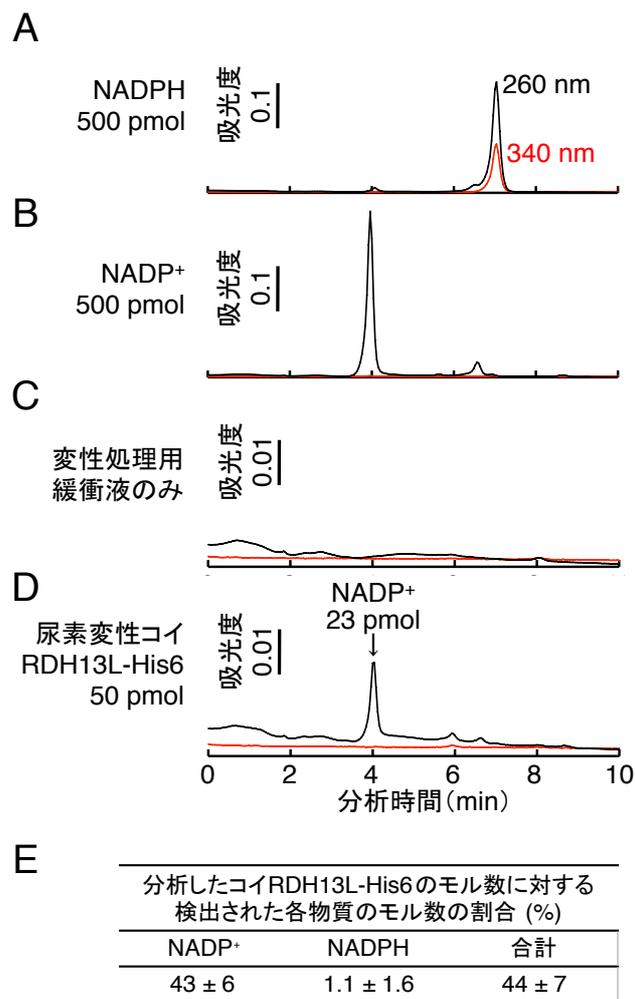


図26 精製コイRDH13L-His6に含まれるNADP(H)の定量 (A-D) Mono QカラムクロマトグラフィーによるNADP(H)の定量。260 nm (黒)、及び340 nm (赤)の2波長における吸収で検出した。標準試料として500 pmolのNADPH (A)、またはNADP⁺ (B)を、また、対照実験として試料を含まない緩衝液のみ (C)を分析し、尿素変性処理後のコイRDH13L-His6 50 pmol (D)の分析結果と比較した。実際にはNADP⁺、及びNADPHの検量線を作製するために、標準試料は複数の量で計測を行ったが、図にはその中の一例のみを示した。(E)分析に用いたコイRDH13L-His6のモル数に対するNADP(H)検出モル数の割合。(A-D)と同様の実験を合計3回行い、その平均値 ± 標準偏差を示した。

マウスRDH11、RDH12、RDH13、及びRDH14のAL-OL反応活性測定

AL-OL反応が哺乳動物でも存在するのか検討するために、コイRDH13Lのマウスにおけるオルソログを、NCBIの提供するBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) プログラムを用いて、NCBI Protein Reference Sequences (refseq_protein) から検索した。しかし、目的のオルソログは見つからず、検索結果の最上位にはマウスのRDH11、RDH12、RDH13、及びRDH14がほぼ同じスコアで挙げられた。そこで、これらのタンパク質がAL-OL反応活性を持つのか検討するために、各RDHについてN末端にGSTタグを融合したもの (GST-RDH) を大腸菌で発現させ、精製した。また、対照としてコイRDH13Lについても同様のものを調製した。各精製GST-RDHのAL-OL反応活性を測定したところ、GST-コイRDH13LとGST-マウスRDH14のみから活性が検出された (図27)。検出された活性はそれぞれ、GST-コイRDH13Lでは 0.068 ± 0.002 /RDH分子/sec、GST-マウスRDH14では 0.025 ± 0.004 /RDH分子/sec (いずれもn=3、平均値 \pm 標準偏差) であった。

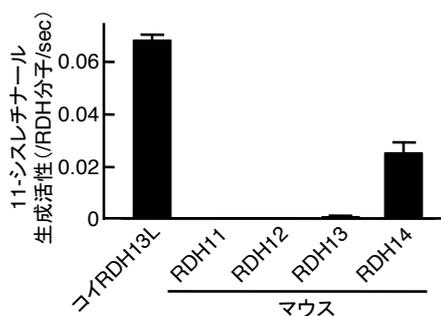


図27 N末端にGSTを融合したコイのRDH13L、マウスのRDH11、RDH12、RDH13、及びRDH14のAL-OL反応活性 $0.1 \mu\text{M}$ の各精製GST-RDHを含む反応溶液 $100 \mu\text{l}$ に、11-シスレチノールとA₂型オールトランスレチナール (各 $250 \mu\text{M}$) を反応させ、11-シスレチナール生成活性 (/RDH分子/sec) を測定した。データは平均値 \pm 標準偏差 (n=3)、または平均値 \pm 2回の測定のばらつき (n=2)。

コイRDH13LとマウスRDH14のAL-OL反応活性とNADP⁺依存的な11-シスレチノール酸化反応活性

図27の結果から、マウスRDH14には補酵素に依存しない、AL-OL反応の活性があることが示された。しかし以前、ヒトのRDH14は補酵素NADPH依存的な11-シスレチナール還元活性を持つことが報告されていた (Haeseleer *et al.*, 2002)。このことから、マウスRDH14もその活性を持ち、同時にその逆反応 (補酵素NADP⁺依存的な11-シスレチノール酸化反応) の活性も持つことが予想された。そこで、GST-マウスRDH14の、NADP⁺依存的な11-シスレチノール酸化活性とAL-OL反応活性 (即ち、A₂型オールトランスレチナール依存的な11-シスレチノール酸化活性) を比較する実験を行った (図28A)。コイRDH13Lとの比較を念頭に、コイの体温 (変温動物であるコイの活動温度は $15\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$; 財団法人 下水道新技術推進機構, 2002)、及びマウスの体温 ($38 \text{ }^\circ\text{C}$) を考慮して、 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、及び $37 \text{ }^\circ\text{C}$ の3つの温度条件で両反応の活性を測定した。その結果、GST-マウスRDH14はAL-OL反応活性とNADP⁺依存的な11-シスレチノール酸化活性の両方を示したが、面白いことに、2つの反応はそれぞれ異なる温度依存性を示し、 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ではAL-OL反応活性の方が有意に高く、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ においてはその差はほとんどなかった (図28A)。同様の実験をGST-コイRDH13Lでも行ったところ、GST-コイRDH13Lも $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ではAL-OL反応活性の方が有意に高く、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ においてはその差はほとんどなかった (図

28B)。さらに、先行研究においてはNADP⁺依存的な11-シスレチノール酸化活性を持たないことが示されていたコイ錐体膜試料についてもこの実験を行ったところ、同様の結果が得られ、37 °Cにおいては特に顕著なNADP⁺依存的な11-シスレチノール酸化活性を検出した (図28C)。

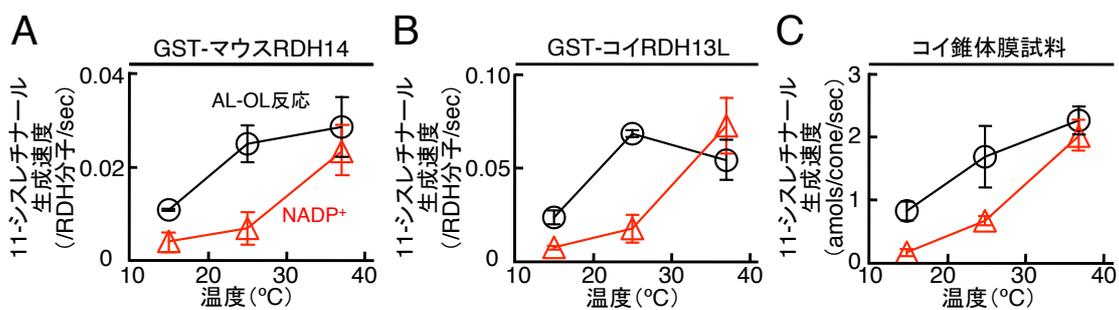


図28 AL-OL反応活性とNADP⁺依存的な11-シスレチノール酸化活性の温度依存性 (A-C) 0.1 μM の GST-マウス RDH14 溶液 (A)、GST-コイ RDH13L 溶液 (B)、または11万個の精製コイ錐体から調製した膜試料 (C) 100 μl に、11-シスレチノール (250 μM) とともに、A₂型オールトランスレチナール (250 μM、黒; AL-OL 反応) を、NADP⁺ (200 μM、赤; NADP⁺) を反応させ、11-シスレチナール生成速度を測定した。測定は、15 °C、25 °C、または37 °C の温度条件で行い、グラフには11-シスレチナール生成速度を温度に対してプロットした。データは平均値 ± 標準偏差 (n=3)。

考察

本章ではまず、AL-OL 反応触媒酵素を同定するために、コイ錐体から AL-OL 反応活性を示すタンパク質を部分精製した (図 18)。そして、部分精製試料に含まれるタンパク質群から、触媒酵素の有力な候補としてコイ RDH13L を同定した (表 5)。次いで、精製コイ RDH13L-His6 (図 21) や、RDH13L を発現した Sf9 膜試料 (図 22) が AL-OL 反応活性を示すことを確認した。また、コイ錐体に発現することが知られている RDH8、RDH8L2、及び RDH13 についても、それぞれを発現した Sf9 膜試料を用いて同様の検討を行い、RDH13 が AL-OL 反応活性を示し、RDH8 と RDH8L2 は示さないことを確認した (図 22)。さらに、コイ錐体が持つ AL-OL 反応活性に対する RDH13L の寄与を検討するために、コイ錐体に発現する RDH13L が持つ AL-OL 反応活性の大きさ (図 23)、RDH13L の細胞内局在 (図 24)、及び RDH13L の基質特異性 (図 25) を解析し、それぞれの結果を対応するコイ錐体のデータと比較した。その結果コイ RDH13L は、細胞内局在の点において、コイ錐体の AL-OL 反応活性と一致した特性を示したが、活性の大きさと基質特異性の二点において、完全には一致しなかった。また、AL-OL 反応に対する NADP(H) の関与を検討するために、精製コイ RDH13L-His6 に含まれる NADP(H) を定量した。その結果、コイ RDH13L が、その分子内に NADP⁺ を強く結合することが示唆された (図 26)。最後に、AL-OL 反応が哺乳動物でも存在するのか検討するために、コイ RDH13L と似たアミノ酸配列を持つマウスのタンパク質群、RDH11、RDH12、RDH13、及び RDH14 の AL-OL 反応活性を測定し、この中では RDH14 のみが、AL-OL 反応活性を持つことが示された (図 27)。また、マウス RDH14、コイ RDH13L、及びコイ錐体膜試料について、AL-OL 反応活性と NADP⁺ 依存的な 11-シスレチノール酸化活性の有無と、それぞれの温度依存性を検討した (図 28)。その結果、いずれの試料も両方の活性を有し、15 °C と 25 °C では AL-OL 反応活性の方が高く、37 °C では両反応の活性がほぼ同じになることが分かった。以降では、これらの実験結果に基づき、同一の活性中心で起こると考えられる 2 つの反応、AL-OL 反応と NADP⁺ 依存的な反応、それぞれの分子メカニズム、および、コイとマウスの錐体でのこれら両反応の生物学的な意義について議論する。

コイ RDH13L の反応触媒メカニズム - NADP(H) の関与

精製コイ RDH13L-His6 を調製する過程において、水溶性画分を除去する操作はのべ 5 回以上行われる。それにも関わらず、精製コイ RDH13L-His6 から、モル比で RDH の $44 \pm 7\%$ に相当する NADP(H) が検出された (図 26)。このことから、コイ RDH13L はその分子内に NADP(H) を強く結合することが示唆される。RDH ファミリーに属する他の酵素が、レチノイド酸化還元反応の補酵素として NAD(H)、あるいは NADP(H) を利用すること (Haeseleer *et al.*, 2002) や、コイ錐体の AL-OL 反応活性が NADP(H) の添加によって上昇したこと (図 13) から、コイ RDH13L は、図 15 に示したモデルのように、分子内に強く結合した NADP(H) を利用して AL-OL 反応を触媒していることが予想される。AL-OL 反応は、精製コイ錐体膜試料を用いた 25 °C における実験によって、アルデヒド基質とレチノール基質が両方とも触媒酵素に結合してから反応が起こる逐次反応であることが示唆された (図 12)。このことから、コイ RDH13L も 25 °C では逐次反応機構で AL-OL 反応を触媒するのではないかと考えられる。これらのことか

ら、コイ RDH13L が AL-OL 反応を触媒する仕組みについて考えてみる。精製コイ RDH13L-His6 から検出された NADP(H) がほぼ全て NADP⁺ であった (図 26) ことから、このモデルでは RDH13L の初期状態として NADP⁺ 結合状態を考える。まず、RDH13L 内の基質結合部位にレチノール基質が結合する。AL-OL 反応は逐次反応だと考えるので、この時点では反応は起こらず、レチノール基質は RDH13L 内の NADP⁺ と安定な複合体を形成する。次に、その状態の RDH13L にアルデヒド基質が結合し、この複合体に作用する。この作用によって、レチノール基質-NADP⁺ 複合体中の水素と電子が、アルデヒド基質へと移動して AL-OL 反応が起こる。その結果、AL-OL 反応の 2 種類の生成物、レチナルとアルコールが生じる。最後に、これらの生成物が両方とも解離する事で、RDH13L は NADP⁺ だけを結合する初期状態に戻る。

ただし 37 °C において、GST-コイ RDH13L は、AL-OL 反応活性に加えて、それと同程度の NADP⁺ 依存的な 11-シスレチノール酸化活性も示した (図 28B)。このことから、37 °C では RDH13L 内にできたレチノール基質-NADP⁺ 複合体は安定化せず、アルデヒド基質の作用に依存しない、酸化還元共役反応を起こして、レチナルと NADPH を生じるのではないかと考えている。また、この反応によって RDH13L 内に生じた NADPH は、反応液に NADP⁺ が豊富に含まれる条件 (NADP⁺ 依存的な酸化反応活性の測定条件) では、NADP⁺ に交換され、アルデヒドが豊富に含まれる条件 (AL-OL 反応活性の測定条件) では、次いでアルデヒドとの間で起こる酸化還元共役反応によって NADP⁺ に戻されると考えている。ただし、この 37 °C におけるモデルでは、前者のモデルとは異なり、AL-OL 反応が ping-pong 反応機構で起こることになる。温度に依存して反応機構の変化が起きるのかどうかは、現在検討中である。

コイ錐体の AL-OL 反応に対する RDH13L の寄与

コイ RDH13L が触媒する AL-OL 反応の性質を、精製コイ錐体膜試料のものと比較した結果、細胞内局在 (図 24) の点では両者の性質は一致していたが、基質特異性 (図 25)、及び活性の大きさ (図 23) の点で、完全には一致しなかった。これらの違いは、コイ発現 RDH13L、及びコイ RDH13L-His6 の発現系 (Sf9) に起因するアーティファクトの可能性がある。しかし本研究で得られたデータから、その違いの原因は、コイ錐体が RDH13L とともに他の AL-OL 反応触媒酵素を発現していることではないかと予想している。実際に、先行研究でコイ錐体に発現することが報告された RDH13 (Miyazono *et al.*, 2008) が、AL-OL 反応活性を示した (図 22)。また、GST-マウス RDH14 も AL-OL 反応活性を示した (図 27)。マウス RDH14 のコイオルソログがコイ錐体に発現しているかどうかは分からないが、マウス RDH14 のアミノ酸配列によく似た配列をコードする cDNA がコイ網膜 cDNA ライブラリーから部分的にクローニングされている (宮園、未発表データ) ことから、少なくともマウス RDH14 様のタンパク質がコイ網膜に発現することは分かっている。また、マウス RDH14 は、その mRNA 発現量が、マウス錐体から樹立された培養細胞株 (661W) において顕著なことや、本来桿体に分化する細胞が錐体様の細胞に分化するノックアウトマウス (Nrl^{-/-}) の網膜で、野生型のものより上昇することから、マウスでは錐体に発現することが示唆されている (Kanan *et al.*, 2008)。これらのことから、コイ錐体で起こる AL-OL 反応は RDH13L だけではなく、RDH13 や RDH14 など、他の酵素によっても触媒されているのではないかと考えている。このように、複数種類の酵素が AL-OL 反応活性を有しているため、RDH13L の活性の大きさや、基質特異性だけでは精製コイ

錐体膜試料の AL-OL 反応活性や基質特異性の全てを説明できないのであろうと考えている。

コイの RDH13 や RDH13L が AL-OL 反応活性を示した (図 22) のに対して、GST-マウス RDH13 は活性を示さず、GST-マウス RDH14 が示した (図 27)。先行研究で行われた分子系統樹解析では、コイの RDH13 と RDH13L は、マウス RDH14 よりマウス RDH13 に近い系統に属することが示唆されている (Miyazono、博士学位論文、2008)。しかし、本研究の結果からは、それらの RDH がマウス RDH14 に近い系統に属することが示唆される。

錐体での 11-シスレチナール合成における AL-OL 反応と NADP⁺ 依存的反応の寄与

先行研究 (Miyazono *et al.*, 2008) において、コイ錐体は NADP⁺ 依存的な 11-シスレチノール酸化活性をほとんど持たないことが報告されていた。しかし、本研究でその活性を測定した結果、15 °C ではほとんど検出されなかったが、25 °C では有意に、37 °C においては AL-OL 反応活性と同等に検出された (図 28C)。先行研究で活性が検出されなかった原因は、活性測定の際、測定温度への配慮が行われず、測定が 25 °C より低い温度で行われたためではないかと考えられる。本研究の結果、温度が上昇すれば、コイ錐体での 11-シスレチナール合成は、AL-OL 反応だけではなく、NADP⁺ 依存的にも行われることが分かった。何れの反応も、錐体の置かれる環境に依存して、11-シスレチノールから 11-シスレチナールへの酸化反応に寄与していると考えることが出来る。

ではどのような環境条件のときにどちらの反応がどの様に寄与するのであろうか。コイ錐体膜試料を例に考察してみよう。生体内の錐体には 11-シスレチノールとともに、NADP(H) も充分量供給されると考える。錐体についての環境条件としては温度とアルデヒド基質の濃度を考えることができる。変温動物のコイの体温は水温に依存し、飼育適水温は 15-30 °C と報告されている (財団法人 下水道新技術推進機構、2002)。このことから、コイ錐体では水温が低い環境では主に AL-OL 反応で 11-シスレチナールの生成が行われていると考えられる。一方、温度が高くなると両反応は同程度の速度で進行することから両者の寄与はほぼ等しくなると想像される。もし温度が高くてアルデヒドが不足する場合、NADP⁺ 依存的な反応が優位に働くと考えられる。万が一 NADP⁺ 濃度が低下すれば、AL-OL 反応のみでも 11-シスレチナール合成は進行する。つまり、両反応が存在することで、錐体は様々な条件下で 11-シスレチナール合成を行い、その視覚機能を発揮することが可能になる。

一方、マウスの錐体では RDH14 が発現しており (Kanan *et al.*, 2008)、38 °C で一定の体温のもと、少なくとも RDH14 の働きにより、環境変化に対応して 11-シスレチナールが合成されているのではないかと想像している。ニワトリ、及び地リスの網膜は、他の多くの動物種と比較して視細胞中の錐体の割合が高い事が知られているが、Mata ら (2002) は、そうした網膜から NADP⁺ 依存的な 11-シスレチノール酸化活性を検出している。彼らの測定は 33 °C で行われていることから、恒温動物では一般に、錐体に発現している RDH14 が、AL-OL 反応と NADP⁺ 依存的な反応の両方で 11-シスレチナール合成に関与している、と考えて矛盾が無さそうである。

今後の見通し

本研究で、コイ錐体における効率的な 11-シスレチナール生合成を担うと考えられる酵素の一つとして、RDH13L を同定した。しかし、同様の働きをする酵素はまだ他にもあると予想され、コイ錐体の 11-シスレチナール生合成機構の正確な理解に向けてはさらなる研究が必要である。また、本研究では AL-OL 反応触媒酵素としてコイ RDH13L、コイ RDH13、及びマウス RDH14 を同定し、AL-OL 反応という新規の反応のメカニズムに対する理解が分子レベルで進んだ。今後は、分子生物学的な手法を適用する事によって、さらに詳細なレベル、即ち各触媒酵素を構成する各アミノ酸残基のレベルで、理解を進めることができるであろう。さらに、マウス RDH14 はモデル生物のマウスから同定されたので、その機能解析にはノックアウトマウスの作製を始めとした様々な手法が適用できる可能性がある。そのような手法を用いて、マウス錐体内での RDH14 の機能を解析する事により、錐体で起こる 11-シスレチナールの生合成が、錐体の光受容にどのように寄与しているのか、評価できると考えている。

引用文献

- Ala-Laurila, P., Kolesnikov, A. V., Crouch, R. K., Tsina, E., Shukolyukov, S. A., Govardovskii, V. I., Koutalos, Y., Wiggert, B., Estevez, M. E., and Cornwall, M. C. (2006) Visual cycle: Dependence of retinol production and removal on photoproduct decay and cell morphology. *J. Gen. Physiol.* **128**, 153-169
- Ala-Laurila, P., Cornwall, M. C., Crouch, R. K., and Kono, M. (2009) The action of 11-*cis*-retinol on cone opsins and intact cone photoreceptors. *J. Biol. Chem.* **284**, 16492-16500
- Arinobu, D., Tachibanaki, S., Kawamura, S. (2010) Larger inhibition of visual pigment kinase in cones than in rods. *J. Neurochem.* **115**, 259-268
- Bisswanger, H. (2008) Multi-substrate reactions. in *Enzyme Kinetics: Principles and Methods* (Bisswanger, H., ed), 2nd Ed., Section 2.6, pp. 124-134, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany
- Chen, C., Thompson, D. A., and Koutalos, Y. (2012) Reduction of all-*trans*-retinal in vertebrate rod photoreceptors requires the combined action of RDH8 and RDH12. *J. Biol. Chem.* **287**, 24662-24670
- Collery, R., McLoughlin, S., Vendrell, V., Finnegan, J., Crabb, J. W., Saari, J. C., and Kennedy, B. N. (2008) Duplication and divergence of zebrafish CRALBP genes uncovers novel role for RPE- and Müller-CRALBP in cone vision. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 3812-3820
- Das, S.R., Bhardwaj, N., Kjeldbye, H., and Gouras, P. (1992) Muller cells of chicken retina synthesize 11-*cis*-retinol. *Biochem. J.* **285**, 907-913
- Fu, Y., and Yau, K. W. (2007) Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers. Arch.* **454**, 805-819
- Haeseleer, F., Jang, G. F., Imanishi, Y., Driessen, C. A., Matsumura, M., Nelson, P. S., Palczewski, K. (2002) Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *J. Biol. Chem.* **277**, 45537-45546
- Hubbard, R., Brown, P. K., and Bownds, D. (1971) Methodology of vitamin A and visual pigments. *Methods Enzymol.* **18**, 615-653
- Irie, T., and Seki, T. (2002) Retinoid composition and retinal localization in the eggs of teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **131**, 209-219
- Jin, J., Jones, G. J., and Cornwall, M. C. (1994) Movement of retinal along cone and rod photoreceptors. *Vis. Neurosci.* **11**, 389-399
- Jin, M., Li, S., Moghrabi, W. N., Sun, H., and Travis G.H. (2005) Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell*, **122**, 449-459
- Jones, G. J., Crouch, R. K., Wiggert, B., Cornwall, M. C., and Chader, G. J. (1989) Retinoid requirements for recovery of sensitivity after visual-pigment bleaching in isolated photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 9606-9610

- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H., Persson, B. (2002) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Eur. J. Biochem.* **269**, 4409-4417
- Kanan, Y., Kasus-Jacobi, A., Moiseyev, G., Sawyer, K., Ma, J. X., Al-Ubaidi, M. R. (2008) Retinoid processing in cone and Müller cell lines. *Exp. Eye. Res.* **86**, 344-354
- Kawamura, S., and Tachibanaki, S. (2008) Rod and cone photoreceptors: molecular basis of the difference in their physiology. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **150**, 369-377
- Kaylor, J. J., Yuan, Q., Cook, J., Sarfare, S., Makshanoff, J., Miu, A., Kim, A., Kim, P., Habib, S., Roybal, C. N., Xu, T., Nusinowitz, S., and Travis, G. H. (2013) Identification of DES1 as a vitamin A isomerase in Müller glial cells of the retina. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 30-36
- Kefalov, V. J., Estevez, M. E., Kono, M., Goletz, P. W., Crouch, R. K., Cornwall, M. C., and Yau, K. W. (2005) Breaking the covalent bond--a pigment property that contributes to desensitization in cones. *Neuron* **46**, 879-890
- Kiser, P. D., Golczak, M., Maeda, A., and Palczewski, K. (2012) Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina. *Biochim. Biophys. Acta.* **1821**, 137-151
- Kolesnikov, A. V., Tang, P. H., Parker, R. O., Crouch, R. K., and Kefalov, V. J. (2011) The mammalian cone visual cycle promotes rapid M/L-cone pigment regeneration independently of the interphotoreceptor retinoid-binding protein. *J. Neurosci.* **31**, 7900-7909
- Liu, R. S., and Asato, A. E. (1984) Photochemistry and synthesis of stereoisomers of vitamin A. *Tetrahedron* **40**, 1931-1969
- Maeda, A., Maeda, T., Imanishi, Y., Kuksa, V., Alekseev, A., Bronson, J. D., Zhang, H., Zhu, L., Sun, W., Saperstein, D. A., Rieke, F., Baehr, W., and Palczewski, K. (2005) Role of photoreceptor-specific retinol dehydrogenase in the retinoid cycle in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**, 18822-18832
- Mata, N. L., Radu, R. A., Clemmons, R. C., and Travis, G. H. (2002) Isomerization and oxidation of vitamin A in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron* **36**, 69-80
- Matsumoto, H., and Yoshizawa, T. (1975) Existence of a β -ionone ring-binding site in the rhodopsin molecule. *Nature* **258**, 523-526
- Matsumoto, H., Nakamura, Y., Tachibanaki, S., Kawamura, S., and Hirayama, M. (2003) Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3560-3563
- Miyazono, S., Shimauchi-Matsukawa, Y., Tachibanaki, S., and Kawamura, S. (2008) Highly efficient retinal metabolism in cones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 16051-16056
- Miyazono, S. (2008) Retinal metabolism in rod and cone photoreceptors. 大阪大学大学院生命機能研究科博士学位論文

- Moiseyev, G., Chen, Y., Takahashi, Y., Wu, B. X., and Ma, J. X. (2005) RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 12413–12418
- Okano, T., Fukada, Y., Artamonov, I. D., and Yoshizawa, T. (1989) Purification of cone visual pigments from chicken retina. *Biochemistry* **28**, 8848-8856
- Pazos, Y., Iglesias, B., de Lera, A. R. (2001) The Suzuki coupling reaction in the stereocontrolled synthesis of 9-*cis*-retinoic acid and its ring-demethylated analogues. *J. Org. Chem.* **66**, 8483-8489.
- Redmond, T. M., Poliakov, E., Yu, S., Tsai, J. Y., Lu, Z., and Gentleman, S. (2005) Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 13658–13663
- Reinheckel, T., Noack, H., Lorenz, S., Wiswedel, I., and Augustin, W. (1998) Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. *Free Radic. Res.* **29**, 297-305
- Saari, J. C. (2012) Vitamin A metabolism in rod and cone visual cycles. *Annu. Rev. Nutr.* **32**, 125-45.
- Schenkels, P., and Duine, J. A. (2000) Nicotinoprotein (NADH-containing) alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 1069: an efficient catalyst for coenzyme-independent oxidation of a broad spectrum of alcohols and the interconversion of alcohols and aldehydes. *Microbiology* **146**, 775-785
- Shimauchi-Matsukawa, Y., Aman, Y., Tachibanaki, S., Kawamura, S. (2005) Isolation and characterization of visual pigment kinase-related genes in carp retina: polyphyly in GRK1 subtypes, GRK1A and 1B. *Mol. Vis.* **11**, 1220-1228
- Suzuki, T., and Makino-Tasaka, M. (1983) Analysis of retinal and 3-dehydroretinal in the retina by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **129**, 111-119
- Tachibanaki, S., Tsushima, S., and Kawamura, S. (2001) Low amplification and fast visual pigment phosphorylation as mechanisms characterizing cone photoresponses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 14044-14049
- Tachibanaki, S., Arinobu, D., Shimauchi-Matsukawa, Y., Tsushima, S., and Kawamura, S. (2005) Highly effective phosphorylation by G protein-coupled receptor kinase 7 of light-activated visual pigment in cones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 9329-9334
- Tang, P. H., Kono, M., Koutalos, Y., Ablonczy, Z., and Crouch, R. K. (2013) New insights into retinoid metabolism and cycling within the retina. *Prog. Retin. Eye. Res.* **32**, 48-63
- Tanito, M., Elliott, M. H., Kotake, Y., and Anderson, R. E. (2005) Protein modifications by 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexenal in light-exposed rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 3859-3868
- Trehan, A., Liu, R. S., Shichida, Y., Imamoto, Y., Nakamura, K., and Yoshizawa, T. (1990) On retention of chromophore configuration of rhodopsin isomers derived from three *dicis* retinal isomers. *Bioorg. Chem.* **18**, 30-40

- Wada, A., Fukunaga, K., Ito, M., Mizuguchi, Y., Nakagawa, K., and Okano, T. (2004) Preparation and Biological Activity of 13-Substituted Retinoic Acids. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 3931-3942.
- Wang J. S., and Kefalov, V. J. (2011) The cone-specific visual cycle. *Prog. Retin. Eye Res.* **30**, 115-128
- Wittig, I., Karas, M., Schägger, H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics.* **6**, 1215-1225
- Zonta, F., and Stancher, B. (1984) High-performance liquid chromatography of retinals, retinols (vitamin A₁) and their dehydro homologues (vitamin A₂): improvements in resolution and spectroscopic characterization of the stereoisomers. *J. Chromatogr.* **301**, 65-75
- 財団法人 下水道新技術推進機構 (2002) 「10. 主要魚介類の生息水温等の報告事例」 『生態系にやさしい下水道の促進に向けた手引書 (案)』 III. 資料編、pp. III-18、国土交通省・地域整備局下水道部

業績一覧

<投稿論文>

- ・ "Substrate Specificity and Subcellular Localization of Aldehyde-Alcohol Redox (AL-OL)-Coupling Reaction in Carp Cones"
Shinya Sato, Takashi Fukagawa, Shuji Tachibanaki, Yumiko Yamano, Akimori Wada, and Satoru Kawamura
Journal of Biological Chemistry, First Published on November 11, 2013,

<学会発表>

- ・ 「コイ錐体膜で起こるレチナール - レチノール酸化還元共役反応」
佐藤慎哉、宮園貞治、橘木修志、河村悟
日本生物物理学会第46回年会（福岡）、2008.12.4.
- ・ 「Highly Effective Retinal Metabolism in Carp Cones」
Sadaharu Miyazono, Shin-ya Sato, Shuji Tachibanaki, Satoru Kawamura
FASEB Summer Research Conferences. The Biology and Chemistry of Vision (Snowmass, Colorado, USA), 2009.6.15
- ・ 「AL-OL coupling: a cone photoreceptor specific reaction for rapid visual pigment regeneration」
佐藤慎哉
National Tsing Hua Univeristy - Osaka University Life Science Student Activity Fair 2011, 2011.5.30.
- ・ 「AL-OL反応：コイ錐体視細胞で起こる11-cis retinal生成反応」
佐藤慎哉、橘木修志、河村悟
日本動物学会第82回大会（旭川）、2011.9.22.
- ・ 「AL-OL反応：コイ錐体視細胞に特異的な11-シスレチナール生成反応」
佐藤慎哉、橘木修志、河村悟
第16回視覚科学フォーラム研究会（埼玉）、2012.8.25.
- ・ 「Substrate Specificity and Localization of AL-OL Coupling Reaction in Carp Cones」
Satoru Kawamura, Shinya Sato, Shuji Tachibanaki and Takashi Fukagawa
ARVO 2013 Annual Meeting (Seattle, Washington, USA)、2013.5.6.
- ・ 「AL-OL反応：錐体視細胞で起こる11-シスレチナール生成反応」
佐藤慎哉、橘木修志、河村悟
日本動物学会第84回大会（岡山）、2013.9.27.
- ・ 「コイ錐体での視物質再生に関与する11-シスレチナール生成反応、AL-OL反応の解析」
佐藤慎哉、深川貴志、橘木修志、河村悟
分子研研究会「ロドプシン研究の故きを温ねて新しきを知る」（岡崎）、2013.11.18.

謝辞

本研究は、著者が大阪大学大学院理学研究科博士後期課程在学中に、同大学大学院生命機能研究科の河村悟教授の指導のもとに行ったものである。本研究の実施にあたり、終始適切な助言を賜り、また丁寧に指導して下さいました河村悟教授に感謝いたします。また、河村研究室の橘木修志准教授、和田恭高助教には細部にわたるご指導をいただきました。ここに感謝いたします。実験に必要な試薬をご提供して頂きました神戸薬科大学の和田昭盛教授、大阪教育大学の關隆晴教授、及び大阪大学蛋白質研究所の古川貴久教授に心より感謝いたします。大阪大学大学院理学研究科の金澤浩名誉教授には、修士学位論文の作成時や中間報告会等の折にご指導、ご助言を賜りました。ありがとうございます。また、同研究科の倉光成紀教授、久富修准教授には本論文の審査を担当して頂きました。深く感謝の意を表します。実験にあたっては、宮園貞治博士（現所属：旭川医科大学助教）、大学院生の山岡弘実さんを始めとした、研究室内の多くの方々にもご協力を頂きました。ありがとうございます。