The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Evidence for the transport of opsin in the connecting cilium and basel rod outer segment in rat retina : rapid-freeze, deep-etch and horseradish peroxidase lebelling studies.
Author(s)	宮口, 勝行
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38711
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【21】

氏　　名	宮口勝行（みやぐち かつゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士　（医　学）
学位記番号	第　10830　号
学位授与年月日	平成5年5月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Evidence for the transport of opsin in the connecting cilium and basel rod outer segment in rat retina: rapid-freeze, deep-etch and horseradish peroxidase lebelling studies. （ラット網膜桿状体結合線毛及び外節基部におけるオプシン輸送：急送凍結エッチ法及びHRP法を用いた研究）
論文審査委員	（主査） 教授　三木　直正 （副査） 教授　祖父江憲治　　教授　塩谷弥兵衛

論文内容の要旨

【目　的】

視細胞桿状体外節基部は円板膜形成の部位として重要であり，ここで形質膜が陥凹又は突出することにより直接的に円板膜が作られると考えられているが，詳細は不明である。私は急速凍結エッチ法でラット網膜を観察し，剥離した網膜をHRP溶液中でincubateすることにより，内節で造られたオプシンがどのような経路で外節円板膜に運ばれるかを明らかにしようとした。また，オプシン分子の円板膜上での存在様式を調べた。

【方　法】

1. 剥離した新鮮，化学固定，及び抗オプシン抗体とレクチンで標識したラット網膜を直ちに液体ヘリウム温度の純銅ブロックに圧着凍結し，Balzerz BAF400Dフリーズエッチ装置で凍結割断後エッチングを施し，回転蒸着によって得たレプリカ膜を電顕観察した。
2. 剥離した網膜をType VI HRPのリンゲル溶液中で15分間incubateして，その取込を観察した。

【成　績】

1. 結合線毛の真外表面において11-15nm径の粒子がnecklace状に配列する事を観察した。その中心間距離は約25nmであった。これは，フリーズフラクチャー法で見られたnecklace particles（約8nm径）に相当する構造であると考えられた。結合線毛のP面には全長にわたり癒合傾向を示す10-12nm径の粒子が見られ，内節とは異なる性状を示していた。前者は外節のP面粒子と同一のものであり，オプシンを反映するものと考えられる。結合線毛より外節基部に移行する部位にはP面に縦の陥凹がみられ，細胞質側にはアクチンが局在する。
2. 外節基部においては，広がったcisternの構造が観察され，そのP面及び内腔表面の構造は円板膜のそれらに対応しており，又，cisternが直接に円板膜に移行している像も観察された。円板膜は辺縁部以外で内腔が消失し，接着しているように見えた。形質膜及び円板膜の細胞質側表面には形態の異なる2種類の粒子が存在し，背の低い方（8.5nm径）は分布密度がP面粒子に対応しており，オプシン分子を反映していると考えらえる。一方背の高い方（10.3nm径）は膜表面に付着しているように見えた。辺縁部の細胞質側表面には背の低い粒子が観察されなかった。

円板膜の内腔表面では平滑で抗オプシン抗体とレクチンで標識された。

3. 剝離した網膜をHRP溶液中でincubateすると，このcistern内，又はcisternと最下層の数層の円板膜内に取込が認められた。又，最下の取込は結合線毛より外節基部に移行する部位にあり，P面の縦の陥凹は，cisternのendocytosisの部位と考えられる。

【総　括】

1. 結合線毛には二種の蛋白質，即ち細胞外に大きく突出するnecklace particlesと，細胞質内に大きく突出するオプシン分子が存在するものと考えられた。結合線毛がオプシン抗体に対して弱い反応を示す理由はnecklace particlesが抗体のaccessを阻害しているためと推察された。又，結合線毛外節移行部位で形質膜はendocytosisされcisternになり，それが円板膜に変化していくと推察された。このように内節で作られたオプシンは，結合線毛形質膜を通り，cisternを経由して円板膜に運ばれることが示唆された。
2. 円板膜においてオプシン分子は細胞質側に大きく突出するが，内腔への突出は小さいと考えれらた。又，円板膜辺縁部にはオプシンは存在しないと考えられる。

審査論文の結果の要旨

本論文は従来不明であった，視細胞桿状内節で造られたオプションが外節円板膜に運ばれる経路，及び，オプシン分子の円板膜上での存在様式をこの論文は明らかにしたものである。

まず，急速凍結エッチ法を用いて，結合線毛には二種の蛋白質粒子，即ち，オプシンと細胞外に大きく突出するnecklace particlesが存在することを示し，結合線毛細胞膜がオプシン抗体に対して弱い反応を示す理由は，オプシンが存在しないからではなく，necklace particlesが抗体のaccessを阻害しているためと推察している。次に，特に，HRP法を用いて，結合線毛外節移行部位で形質膜はendocytosisされcisternになり，それが円板膜に変化していくことを示している。さらに，HRPの最下の取込は結合線毛より外節基部に移行する部位にあり，この部位の細胞膜のP面に発見された縦の陥凹は，cisternのendocytosisの部位と推察している。このようにして，内節で作られたオプシンは，結合線毛細胞膜を通り，cisternを経由して円板膜に運ばれることを明らかにしている。

一方，円板膜の細胞質側表面には辺縁部以外でオプシンに対応する粒子が存在するが，内腔表面は抗オプシン抗体とレクチンで標識されるが平滑であり，従って，オプシン分子は細胞質側に大きく突出するが内腔への突出は小さいと考えている。又，円板膜辺縁部にはオプシンは存在しないと推察している。

以上，本研究を学位授与に値するものと確認する。