



Title	コイ桿体、錐体での視物質脱リン酸化反応の解析
Author(s)	三谷, 弘実
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54041
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

氏 名 (山 岡 弘 実)

論文題名

コイ桿体、錐体での視物質脱リン酸化反応の解析
Analysis of Visual Pigment Dephosphorylation in Carp Rods and Cones

論文内容の要旨

脊椎動物の網膜には2種類の視細胞が存在する。一つは光感度が高いため暗い光環境下で働く桿体であり、もう一つは光感度が低いため明るい光環境下で働く錐体である。このような光検出特性の違いがあるものの、両者は相同なタンパク質群によって構成された相同な光情報伝達カスケードを備えている。

視細胞には光を検出できる光受容体、視物質が存在する。視物質はタンパク質部分（オプシン）と発色団（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することで視物質が活性化し、Gタンパク質であるトランスデュシンを活性化する。活性化したトランスデュシンは下流の光情報伝達カスケードを活性化し、最終的に視細胞の過分極応答を引き起こす。その後、活性化した視物質のオプシン部分はリン酸化されることで不活性型となる。一方で、異性化したオールトランスレチナールは最終的にオプシンから外れる。そして、オプシンは新しく供給された11-シスレチナールと結合することで再生され、視物質となる。視物質が再び光情報伝達カスケードを起動できるようにするためには、一度取り込まれたリン酸を取り除くべきであると考えられている。

前述したように、桿体と錐体では働く光環境が大きく異なる。明るい光環境で働く錐体では、視物質が枯渇しないように高い効率で再利用しなければならないことから、視物質の脱リン酸化活性は錐体の方が高いと予測される。しかし、視物質の脱リン酸化反応についての知見は少なく、この反応がどのような酵素で行われているのについてもほとんど分かっていない。そこで、桿体、錐体での視物質脱リン酸化反応を解析（第一章）し、どのような酵素が視物質脱リン酸化反応を行っているのかを解析する（第二章）ことで、桿体、錐体それぞれにとっての視物質脱リン酸化反応の役割や、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。

最初に、私はコイから精製した桿体、錐体細胞を用いて、両者の細胞内での脱リン酸化活性を比較することにした。その結果、この脱リン酸化活性が桿体、錐体どちらにおいても主に細胞質画分に存在し、桿体よりも錐体の方が約3倍高いことも示した。

次に私は視物質再生サイクルの中のどの段階（オールトランスレチナール遊離前、遊離後、もしくは視物質の再生反応中、反応後）で脱リン酸化反応が起こっているのかを調べることにした。これを調べるため、精製したコイ桿体、錐体膜試料において3種類のリン酸化基質（リン酸化褪色中間体、リン酸化オプシン、リン酸化再生視物質）を調製し、これらの脱リン酸化活性を比較した。私は、再生反応が脱リン酸化反応に与える影響についても調べた。その結果、再生サイクルのどの段階にあるリン酸化基質に対しても脱リン酸化活性は同等であることが示された。このことは脱リン酸化反応が常に起こっていることを主張している。また、このことから明るい光環境下において錐体細胞内には再生したがリン酸は結合したままの視物質が、ある程度存在しており、これが光感受性を落としている可能性も示唆した。

そこで、桿体、錐体において再生したリン酸化視物質の活性化能を測定した。その結果、錐体ではリン酸化された視物質はリン酸化されていない視物質よりも著しく活性が抑えられるが、完全に失活しないことが示され、錐体細胞内でのリン酸化視物質が光感受性を落とすことを強く主張する結果となった。私は桿体、錐体脱リン酸化酵素の同定を試みた。残念ながら、この脱リン酸化酵素の同定には至らなかったが、その酵素が細胞質に多く存在することを示唆した。また、この酵素がこれまで言われてきた脱リン酸化酵素ではない可能性についても言及した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (三 谷 弘 美)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	小倉 明彦 
	副 査	教授	山本 宣彦
	副 査	准教授	吉野 恵子

論文審査の結果の要旨

脊椎動物網膜の視物質（レチナールとオプシンまたはオプシン相同タンパクの複合体）は、網膜内で何回も再生されて利用されるが、光受容後に光異性化レチナールがタンパク質から解離するとともに、タンパク質はリン酸化されて不活性化される。したがって、タンパク質が脱リン酸化されないかぎり、視物質は機能的に再生しない。従来、視物質の脱リン酸化反応は、視物質の再生サイクル中のどこか特定の段階で生じると想定されていたが、確実な証拠はえられていなかった。

三谷君は、視物質の再生サイクル中の各段階ごとの基質を調製し、それらに対する脱リン酸化を測定した。その結果、脱リン酸化反応は特定の段階に限定されず、定常的にほぼ一定の速度で起こることを明らかにした。

脊椎動物の網膜中には2種類の視細胞、桿体と錐体、が存在する。桿体は弱い光の下で働き、錐体は強い光の下で働く。強光下では、活性化も不活性化も速いので、再生が遅いと視物質は枯渇してしまう。したがって、錐体の脱リン酸化速度は、桿体のそれに比べて速いと推測される。三谷君は、桿体と錐体の膜標本での脱リン酸化の計測から、脱リン酸化は錐体で桿体の約3倍速いという結果をえた。視細胞膜標本に視細胞細胞質成分を加えると脱リン酸化反応が促進されることを利用して、脱リン酸化酵素の薬理学的性質を解析した。その結果、既知のタンパク脱リン酸化酵素とは異なる新規酵素の存在が推測された。

これらの成果は、視覚現象の素過程の理解を進めるものであり、本論文は同君に博士学位を授与するに値すると判断される。