The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Purification of rod and cone outer segment from carp retina and proteomic analysis of their membrane proteins
Author(s)	深川, 貴志
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/67056
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　深川　貴志　）	
論文題名	Purification of rod and cone outer segment from carp retina and proteomic analysis of their membrane proteins. (コイ網膜からの桿体と錐体の外節の精製及びそれらに含まれる膜蛋白質のプロテオミクス解析)

論文内容の要旨

脊椎動物の網膜には、桿体と錐体の２種類の視細胞が存在する。いずれの視細胞も、外節、内節、細胞体及びシナプス末端と呼ばれる４つの部位から構成されている。外節は光刺激を膜電位変化に変換する働きを担っており、光に対する電気応答を発生させる分子メカニズム(光応答発生機構)に関わる蛋白質が存在している。

桿体と錐体では、光応答発生機構に関わる蛋白質が相同であるにも関わらず、光に対する応答特性が異なる。桿体は光に対する感度が高く、応答の終息が遅いのに対し、錐体は感度が低く、応答終息は速い。この違いは、光応答発生機構に関わる蛋白質の違いに起因すると考えられる。また、桿体と錐体では外節の構造が大きく異なる。桿体の外節は、約1000枚の円板膜が積層した状態で形質膜に取り囲まれているが、錐体の外節は1枚の連続した形質膜がラメラ状に何層にも積み重なっている。この違いは、外節の形態形成や維持に関する蛋白質の違いによると考えられる。

これらの応答特性及び構造の違いは、外節に存在する蛋白質の違いに起因する可能性が高い。これまで、光応答発生機構に関する蛋白質については詳細に調べられており、桿体と錐体では相同ではあるが異なる蛋白質が発現し、その活性や発現量が異なることが報告されている。しかし、光応答発生機構に関与する蛋白質以外で一方の外節に特異的または主要に発現している蛋白質の積極的な探索は行われていない。このような蛋白質を効率よく探索する方法として、精製された桿体外節と錐体外節に含まれる蛋白質を比較することが考えられる。しかし、桿体外節の精製方法は既に確立しているものの、錐体外節の精製技術は確立しておらず、桿体と錐体の外節に含まれる蛋白質の比較がこれまではできなかった。そこで私は、錐体外節の精製方法を確立し、桿体外節と錐体外節に含まれる蛋白質を網羅的に比較することで、一方の外節に特異的または主要に存在している蛋白質を新たに見出すことにした。

最初に、錐体外節の精製方法の確立を試みた。これまで、桿体外節は網膜から容易に精製できるものの、錐体外節を同様の方法で精製することは困難であった。なぜならば、ほとんどの動物の網膜では、桿体に比べて錐体は圧倒的に数が少ないためである。一方で、近年コイの網膜から桿体と錐体を大量に精製する技術が、申請者の所属していた研究室で確立された。そこで、精製錐体からさらに外節を精製することにした。コイ網膜から精製した桿体または錐体の懸濁液を機械的に破砕し、細胞の外節と内節を分離した。次に、分離した外節由来の膜(以降外節膜と表記する)と内節由来の膜(以降内節膜と表記する)の混じった試料を、様々なショ糖による不連続密度勾配遠心法により分離することを試みた。分離後、外節膜並びに内節に局在するミトコンドリア膜、小胞体膜及び内節形質膜に局在する蛋白質を指標に、どの膜がどの画分に分画にされたか確認した結果、桿体では0/36/50％(w/v)の、錐体では0/36/70％(w/v)の三層からなる不連続密度勾配を用いたとき、桿体と錐体のいずれも0/36 ％ (w/v)界面に外節膜が豊富に含まれることが分かった(外節膜主要画分)。また、この過程で内節膜を豊富に含む画分(内節膜主要画分)も得ることができた。

次に、桿体と錐体の外節膜主要画分及び内節膜主要画分に含まれている蛋白質の網羅的な解析を行った。まず、実験・解析の容易さから、膜に強固に結合している蛋白質を解析の対象とし、他の蛋白質を除去する処理をした。処理後の各画分についてLC-MS/MSによる解析を行い、各画分に含まれる蛋白質のリストを得た。桿体と錐体それぞれの外節膜主要画分及び内節膜主要画分に含まれる蛋白質リストを比較することで、桿体または錐体の外節膜主要画分に特異的にまたは主要に存在する蛋白質をいくつか見出した。見出した蛋白質には、桿体または錐体の外節に特異的に発現していることが知られている蛋白質も外節膜画分に含まれており、これらの蛋白質は正しく分画されていたことから、今回行った分離・比較解析手法は有効であったといえる。また、錐体外節膜主要画分に特異的に検出された蛋白質neurocalcin delta Bについて、実際に局在解析を行ったところ、確かに錐体外節に存在することが示された。これらの結果から、桿体または錐体のいずれかの外節に特異的または主要に発現している蛋白質の候補をいくつか見出すことができた。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　深川　貴志　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	藤田　一郎
	副 査　教 授	山本　亘彦
	副 査　教 授	高島　成二
	副 査　教 授	平岡　泰

論文審査の結果の要旨

脊椎動物には二種類の視細胞、桿体と錐体があり、両者の外節と呼ばれる部位では機能・構造の相違が特に顕著である。深川貴志君はこの相違に関する分子基盤を明らかにするため、一方の外節に特異的・主要な蛋白質の探索・解析に取り組んだ。

コイの網膜より分離採取した視細胞を破砕し、密度勾配遠心法で分画することで外節を精製する手法をまず確立した。こうして得られた桿体及び錐体の外節に含まれる蛋白質を比較し、桿体または錐体の外節に特異的あるいは主要な蛋白質候補をそれぞれ６２個、２４個得た。さらに、錐体外節特異的な蛋白質候補のひとつ、Neurocalcin delta B が桿体外節には存在せず、錐体外節に存在することを免疫組織学的手法により示した。

以上の成果は、桿体と錐体の外節の相違に関する新たな分子基盤の解明を促進させるものであり学位授与に値すると考える。