

錐体オプシンの分子特性が視覚に及ぼす影響

板良敦 朝飛 (筑波大学生物学類) 指導教員: 櫻井 啓輔 (筑波大学生命環境系)

【背景と目的】

脊椎動物の視覚を担う視細胞には、桿体視細胞と錐体視細胞の機能の異なる2種類がある。暗所視を司る桿体視細胞は薄暗い光を感知できるのに対し、明所視を司る錐体視細胞は明るい光でも飽和することなく光受容できる。また暗順応は、桿体視細胞よりも錐体視細胞の方が速く起きることが知られている。

視細胞には光受容タンパク質であるオプシンが発現しており、これが発色団である11-*cis*レチナールと結合することによって、光を受容できる視物質になる。視物質は光を受容すると、11-*cis*レチナールがall-*trans*レチナールに光異性化され、メタ中間体と呼ばれる状態に変化する。このメタ中間体がGタンパク質を活性化し、光応答が起こる。その後、視物質からall-*trans*レチナールが解離し、レチナールを含まないオプシンとなるため光受容能は失われる。オプシンが再び光受容能をもつには、視覚サイクルによって供給される11-*cis*レチナールと再結合する必要がある。このような視物質が光異性化してからレチナールを再結合するまでの反応を「オプシンの光反応」と呼ぶ。

桿体視細胞にはロドプシン、錐体視細胞には錐体オプシンと呼ばれる異なるオプシンが発現しており、光反応の速度などの分子特性が異なることが知られている。すなわち、ロドプシンの光反応は約1時間と非常に遅いものに対して、錐体オプシンの光反応にかかる時間は1分未満と速い。錐体オプシンの特徴である速い光応答は、暗順応や明順応などの視覚の生理学的機能に関連していると考えられる。しかし分子特性が生体内で錐体視覚にどのような影響を与えるのかは依然として解明されていない。

本研究では、錐体オプシンの光反応速度に関わる200番目のアミノ残基に変異を加えることで、光反応速度がロドプシンに似た特性を示す錐体オプシンを発現するノックイン(KI)マウスを用いて、錐体オプシンの分子特性が錐体視細胞の視覚機能にどのような影響を与えるかを検証した。

【方法】

・遺伝子改変マウス
ゲノム編集法により当研究室で作出された、緑錐体オプシン遺伝子*OPN1mw*の200番目のアミノ酸であるプロリンをイソロイシンに置換したKIマウス、*OPN1mw*ノックアウトマウスを用いた。マウスの遺伝子型はPCR法により解析した。

・網膜電図 Electroretinogram (ERG)
生後4~6週齢のマウスを一晚暗順応させ、実験操作は赤色光または暗黒下で行った。測定前に三種混合麻酔薬(メドミジン、ミダゾラム、ブトルファノール)を腹腔内投与し麻酔した。緑色光(波長: 505 nm)を光ファイバーを介して麻酔下のマウスの左眼を刺激し、網膜で誘発される電位を記録した。網膜の電位は、それぞれ眼の角膜上と口腔内に配置された2つの電極間の電位差を差動増幅器で増幅し測定した。網膜の光応答の一般的な波形は二相性を示し、負方向の波形成分であるa-waveは桿体視細胞及び錐体視細胞由来に由来し、正方向の波形成分であるb-waveは双極細

胞に由来することが知られている。

(実験1) 桿体視細胞及び錐体視細胞の光感度を比較する為に、単発フラッシュ光(duration: 1 ms)の刺激強度を段階的に変化させ、各刺激強度における網膜の光応答の振幅を記録した。

(実験2) 桿体視細胞及び錐体視細胞の光応答速度を比較する為に、連続的なフラッシュ光刺激の間隔を様々に変化させることで得られる光応答(フリッカー応答)の振幅を記録した。一般的に、光応答速度が遅いほど、フリッカー応答の振幅はより低周波の条件下で減弱する。

(実験3) 暗順応の特性を調べるために、90%以上の視物質が反応する強い光を眼に与えた後、暗黒下において光応答の振幅の回復を記録した。

【結果・考察】

(実験1) 単発フラッシュ光によって誘発される網膜の光応答の振幅はa-wave、b-wave共にKIマウスの方がWTマウスよりも全体的に大きい値を示したが、様々な光強度領域における光感度に大きな差はみられなかった。この結果から、錐体オプシンの分子特性の違いは錐体の光感度に影響しないことが示唆される。ただ、マウスの視細胞全体のうち、錐体視細胞は3%と少ないためERGの桿体由来の成分が錐体由来の応答成分に影響を与えている可能性がある。そのため現在、パッチクランプ法により錐体視細胞の単一視細胞応答の測定を試みている。

(実験2) フリッカー光が5 Hzより低い周波数の条件においては、フリッカー応答はWTマウスとKIマウスで大きな違いは見られなかった。この条件下でのフリッカー応答は、主に桿体視細胞に由来することから、桿体視細胞の応答速度はWTマウスとKIマウスで違いがないと考えられる。

一方で、フリッカー光が高い周波数の条件においては、WTマウスに対して、KIマウスではフリッカー応答の振幅が顕著に小さくなった。高周波のフリッカー応答は錐体視細胞に由来することから、錐体視細胞の光応答速度はWTマウスに対して、KIマウスの方が遅いことを示唆される。この結果は、錐体オプシンのメタ中間体の持続時間は錐体視細胞の光応答速度に影響しないと考えられていたこれまでの知見からすると予想外の結果である。

(実験3) 90%以上視物質を光反応(退色)させた後の視細胞の光応答の回復を記録したところ、WTマウスでは退色から1分後から光応答が観察され回復がみられたのに対し、KIマウスでは、退色から20分ほど経ってから、光応答の回復が観察された。この結果から錐体オプシンの光応答速度は、錐体の暗順応の速度に影響することが示唆される。

本研究の実験結果から、錐体オプシン分子特性である速い光反応は、錐体視細胞の特徴である速い光応答速度や暗順応に関与することが明らかになった。