

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15156

研究課題名(和文) 視細胞に備わる高いS/N特性の基盤に関する数理生理学的研究

研究課題名(英文) Mathematical and physiological basis for high S/N ratio of rod photoreceptors

研究代表者

櫻井 啓輔 (SAKURAI, Keisuke)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：20647317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の網膜に存在する桿体視細胞と錐体視細胞はそれぞれ暗所視と明所視を担っており、働く光環境に合わせて光感度や応答速度が異なっている。このような光応答特性の違いに対し両視細胞に存在する光シグナル伝達経路や形態の違いがどのように関与するか明らかにすることを目的に、桿体視細胞のシグナル伝達分子が赤錐体オプシンに遺伝子置換されたマウスモデルの構築を行った。また、視細胞の空間モデルのシミュレーション実験により、視細胞の形態の違いが光応答特性の違いに関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物の視細胞の生理学的研究において、細胞に存在する分子の性質の違いに主眼がおかれ、形態の違いの重要性は考慮されない傾向にあったが、本研究により形態の違いが果たす役割について理論的に証明されたことは重要な意義がある。また、細胞の空間モデリングは任意の形態を構築できる為、視細胞だけでなく他の細胞にも応用可能であることから、今後様々な細胞において形態的要因が果たす役割が明らかになると期待される。

研究成果の概要(英文)：Vertebrate rod and cone photoreceptors are responsible for scotopic and photopic vision, respectively. The light sensitivity and kinetics of these photoreceptors differ depending on their vision. The relationship between photoresponse properties and the phototransduction pathways and morphology in both photoreceptor cells remains unclear. To clarify this, we have created mouse models in which phototransduction molecules in rods are replaced with red cone opsin. In addition, the spatial model of photoreceptor cells revealed that the differences in photoreceptor morphology are involved in the photoresponse characteristics.

研究分野：動物生理学

キーワード：網膜 視細胞 オプシン シミュレーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の網膜には、異なる光環境下で働く桿体視細胞と錐体視細胞が存在しており、それぞれ暗所視と明所視を担っている。それらが働く光環境に合わせて、視細胞の光応答特性も異なっており、桿体は高い光感度を錐体は速い応答速度を示す。暗所での視覚を担う桿体は、僅か1光量子のシグナルを検出することが可能である。桿体におけるこの性質は、光シグナル入力から光応答への変換過程が、高いシグナル伝達効率と低いノイズ特性をもつことに由来する。高いシグナル伝達効率は、1光量子の受容により引き起こされる光応答が、桿体の方が錐体に比べて約30~100倍大きな応答の振幅を示すことに由来する。一方、低いノイズレベルは桿体の光受容タンパク質が極めて熱的に安定であることに由来し、その安定性は、錐体視細胞の視物質に比べ約1,000倍安定であることが知られている。また、桿体の1光量子の受容による光応答のばらつきは極めて小さく、各応答の形状の再現性は高いという特徴を示す。この相同な遺伝子群で構成されている両視細胞の光シグナル伝達経路において、各光シグナル伝達分子による寄与を調べるために、これまで桿体視細胞のシグナル伝達分子を錐体型に置換したマウスモデルを用いた研究が行われてきた。その結果、光シグナル伝達経路の各タンパク質と光応答特性との関連が解明されてきたが未だ不明な点が多い。また、空間的要素すなわち細胞の形態や構成タンパク質の細胞内局在などの特性が光応答特性にどのように影響するかは不明であった。

2. 研究の目的

(1) ロドプシンの遺伝子座に錐体オプシンが発現するマウスモデルの作製

視物質の熱安定性を制御する機構を明らかにするために、視物質の性質決定に重要と考えられるアミノ酸残基を置換した赤錐体視物質を、マウス桿体細胞に発現するマウスモデルの構築を行った。

(2) 時空間シミュレーションを利用した細胞の形態がシグナル伝達効率に与える影響

視細胞におけるこれまでのシミュレーションモデルは、細胞内のシグナル伝達系の酵素反応をもとにしたモデルが多いが、生細胞の形態やタンパク質の局在化などの空間的要因が細胞応答にどのように寄与するのかわからない。そこで、視細胞の形態を元に3次元モデル構築し、シミュレーションにより光応答の再現を行い、桿体及び錐体視細胞の形態の違いや関連タンパク質の細胞内局在の違いが光応答特性に及ぼす影響を明らかにすることを目指した。

(3) イモリ松果体視細胞における光シグナル伝達過程の解析

アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) 松果体は、光が光透過率の頭蓋組織の内側に存在するにもかかわらず、光受容し情報を得ている。松果体光受容器は網膜の視細胞と同じ繊毛型視細胞であるが、多くの脊椎動物では、その光受容部の形態は未発達であるのに対し、例外的に両生類イモリの松果体器官は、網膜の視細胞と同様の発達した構造を持つ。イモリ松果体の形態学的知見に比べて分子的な知見は少ない。そこで本研究ではイモリ松果体の視細胞に存在する光シグナル伝達関連分子を調べた。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/CAS9 によるゲノム編集技術を利用して、桿体視細胞においてロドプシン遺伝子を赤錐体オプシン遺伝子に置換させた。具体的には、0日齢マウス網膜に、エレクトロポレーション法により Cas9、gRNA に加え、2種類のベクターを同時に導入した。一つは、マウス網膜の細胞に対してベクターの導入効率を調べるために CMV プロモーター存在下 GPF 遺伝子をコードするベクターで、もう一つはマウスロドプシン遺伝子座に部位特異的に組換えにより導入する配列で赤錐体オプシン遺伝子と IRES を介して蛍光タンパク質 mCherry 遺伝子配列をコードしているベクターである。これらのベクターを導入後、30日齢のマウス網膜の凍結切片を作製し、導入した遺伝子の発現を免疫組織染色により調べた。

(2) 錐体は形質膜が折りたたまれたラメラ膜を形成しているのに対して、桿体は細胞質に薄い円形の円盤膜を内包した形をしている。また、光シグナル伝達タンパク質の細胞内局在も異なる。そのため視細胞の形態やタンパク質分子の細胞内局在を考慮した視細胞外節の時空間モデル構築を行った。視細胞外節の3次元モデルの空間配置や分子密度は、マウスの桿体視細胞の解剖学的・生化学的知見をもとに構築した。再現したマウス桿体視細胞モデルは、幅・奥行き・高さが $17 \text{ nm} \times 17 \text{ nm} \times 7 \text{ nm}$ の直方体コンパートメントを基本単位とし、桿体視細胞の外節の長さの5%に相当する41ディスク膜領域を約40万個のコンパートメントにより構築した(図1)。各コンパートメントはディスク膜・細胞質・形質膜の要素に分類し、各要素

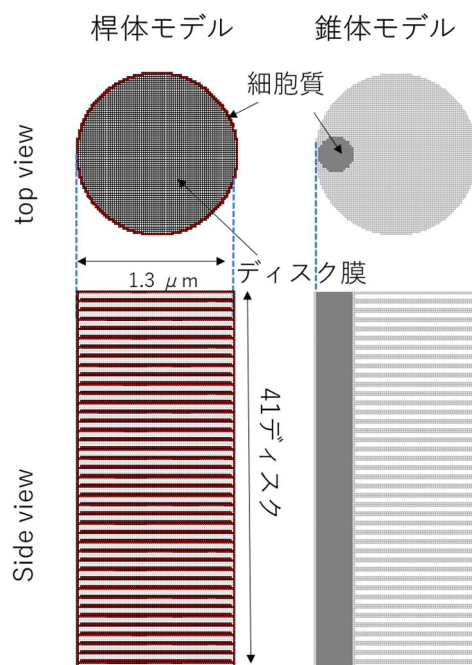


図1 (左) 桿体視細胞の3次元モデルを上面と横面から表した。膜はディスク膜と形質膜で構成される。

(右) 錐体モデルを上面と横面から表した。膜は形質膜のみで構成される。

には光シグナル伝達タンパク質分子を配位させた。同様に、錐体視細胞モデルでは形質膜が折りたたまれたラメラ膜構造を構築し、桿体視細胞の光シグナル伝達タンパク質分子を配位させた。

(3) 成体イモリの松果体を用いたホールマウント免疫染色法を確立し、オプシンやGタンパク質などの視細胞の光シグナル伝達に関するタンパク質の抗体を用いて松果体における発現を調べた。アカハライモリ松果体視細胞の細胞内シグナル伝達系は、*in situ*ハイブリダイゼーション法や免疫組織化学を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) オプシンの熱安定性に関与すると考えられるアミノ酸残基に変異を導入した赤錐体オプシンを、ロドプシンの代わりに桿体視細胞に発現させるために、電気穿孔法によりマウス網膜組織にベクターを導入し、30日齢のマウス網膜の免疫組織染色を行った。その結果、桿体視細胞のロドプシンの代わりに赤錐体オプシンが発現していることが確認された(図2)。ベクターが導入された細胞において、部位特異的に組換えが起きた効率はGFP陽性の細胞数に対するmCherry陽性の細胞数の割合で見積ることができる。その値を計測した結果、ベクターが同導入された細胞の40%~70%の割合で相同組換えが起きていることが分かった。また、変異を導入した赤錐体視物質はマウス桿体視細胞の外節に発現すること確認され、網膜において*in vivo*遺伝子ノックイン系を確立することができた。この系を用いることにより今後の生理学的実験へ向けた基盤が整備された。

(2) 脊椎動物の網膜に存在する2種類の視細胞である桿体と錐体は、それぞれ光応答特性が異なる。この違いに対して視細胞の外節の形態の違いや光シグナル伝達分子の細胞内局在が及ぼす影響を数理モデルにより検証した。マウス桿体視細胞と錐体視細胞の外節の膜構造の違いを反映した3次元モデルを構築(桿体モデル・錐体様モデル)し、各モデルに同様の光シグナル伝達分子が存在する条件下で、シミュレーション実験を行った。実験は構築したモデルにおいてシグナル伝達関連分子の光異性化の開始位置、拡散係数、局在が光応答特性に与える影響を検証した。まず、桿体と錐体モデルにおいて同様の条件で光刺激を与え得られた光応答を比較したところ、光応答の振幅は錐体視細胞モデルが桿体視細胞モデルに比べて1/2倍小さい値を示した。光応答のピークに達するまでの時間を比較したところ、興味深いことに、錐体視細胞モデルが桿体視細胞モデルに比べて速くなった(図3)。各モデルを構成するタンパク質酵素の反応速度や拡散係数は共通の値を用いているため、得られた光応答特性の差は細胞の形態や構成タンパク質の局在の違いを反映していると考えられる。

桿体視細胞の1光子の応答は刺激部位によらず高い再現性を示すことが知られている。そこで次に、この性質と外節の形態との関連を調べるために、光反応の起点であるロドプシンの光異性化が起こるディスク膜上の部位により光応答の形状が変化するかを調べた。その結果、桿体モデルでは刺激部位により光応答の特性の違いが見られなかったのに対して、錐体様モデルではラメラ膜の刺激部位により光応答の振幅や応答の速さに顕著な違いがみられた。このことか

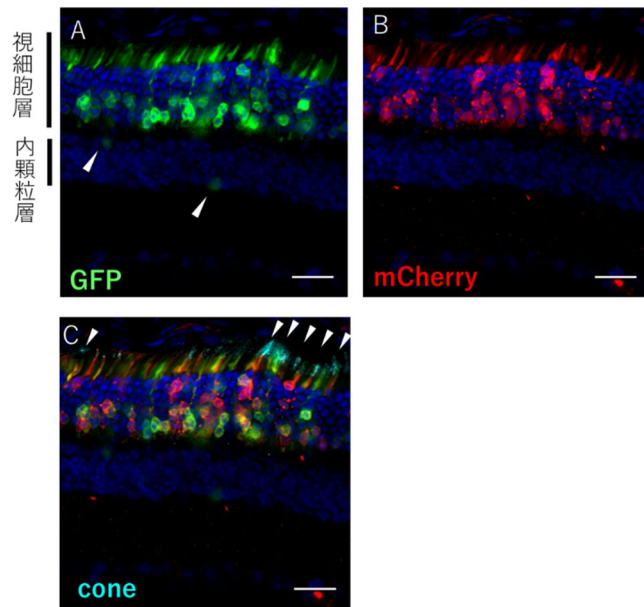


図2 (A) マウス網膜におけるGFP(緑)の発現は視細胞層と内顆粒層の一部の細胞(矢頭)で観察された。(B) mCherryの発現は視細胞層のみで観察された。(C) 錐体オプシン(シアン)は視細胞の外節(矢頭)で発現している。

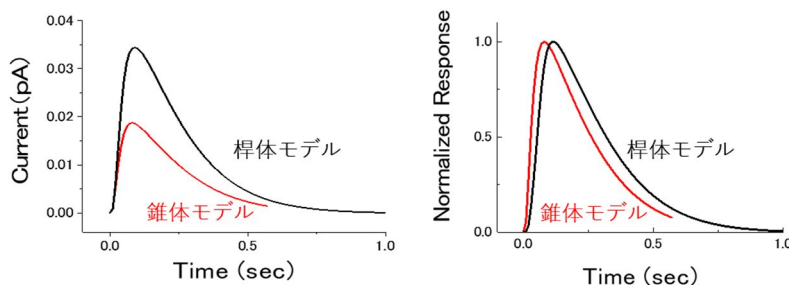


図3 (左) 桿体モデルと錐体モデルから得られた光応答の結果 (右) 桿体モデルと錐体モデルの光応答をピークの高さで正規化した結果

ら、桿体視細胞の外節のディスク膜状の形態を獲得したことにより、光シグナル増幅効率が高くなることに加えて、ロドプシンの光異性化が起きる部位による光応答の偏差が小さくなる効果があることが明らかになった。すなわち、桿体視細胞の外節の形態は、1光量子の刺激に対して効率よく大きな応答を示す効果に加えて、光刺激部位の違いに応じた光応答のばらつきを抑えることにより正確なシグナル変換を可能にする役割があると考えられる。

また、シグナル伝達下流のホスホジエステラーゼのディスク膜上の局在を、「ディスク膜の周辺部のみに不均一に分布させた条件」と「ディスク膜上に均一に分布させた条件」でシミュレーションを行い比較したところ、光応答特性には大きな違いは見られなかったことから、ホスホジエステラーゼの局在は光応答特性に大きな影響を及ぼさないと考えられる

(3) 両生類の松果体視細胞においてピノプシンの発現が報告されているが、本研究ではそれ以外のオプシンやGタンパク質の発現について調べた。抗赤錐体オプシン、抗青錐体オプシン、抗ロドプシンの抗体を用いてホルマウント免疫染色を行ったところ、赤錐体オプシンと青錐体オプシンのシグナルはそれぞれ松果体全体で、ロドプシンのシグナルは一部で確認された(図4A)。また興味深いことに、赤錐体オプシンと青錐体オプシンの二重染色を行った結果、一つの視細胞外節で赤錐体オプシンと青錐体オプシンの共発現が確認された(図4B-D)。赤錐体オプシンと青錐体オプシンは一つの細胞で共発現することで広範囲の波長領域の光受容が可能になると考えられる。次に、ホルマウント免疫染色により松果体視細胞において発現するGタンパク質について調べたところ、抗Gt1抗体のシグナルがほぼ全ての視細胞外節で確認された。また、*in situ*ハイブリダイゼーションによりGt1およびGt2遺伝子の発現を確認したところ、松果体においてGt2遺伝子の発現は確認できなかったのに対して、Gt1遺伝子の発現は松果体の全域で観察された。これらのことから、松果体の光受容細胞において共役するGタンパク質は、主に桿体型のGt1と考えられ、網膜の視細胞の場合と異なり、錐体オプシンと桿体型のGt1が共役する可能性が示唆された。

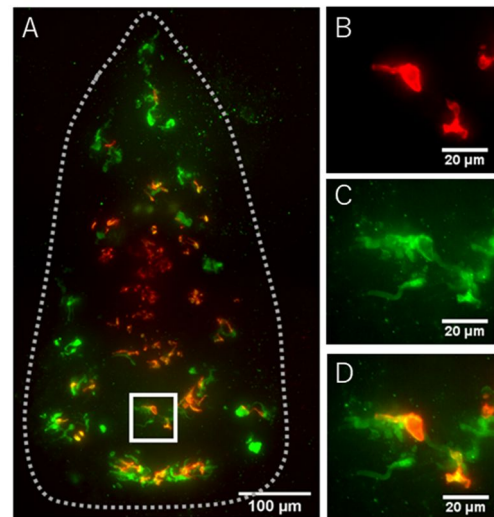


図4 松果体における赤錐体(赤)と青錐体オプシン(緑)の2重染色(A)松果体領域(白点線)における各オプシンの発現(B, C, D)図Aの四角で囲った領域の高倍率像(B)赤錐体オプシン(C)青錐体オプシン(D)CとDの重ね合わせ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Casco-Robles RM, Watanabe A, Eto K, Takeshima K, Obata S, Kinoshita T, Ariizumi T, Nakatani K, Nakada T, Tsonis PA, Casco-Robles MM, Sakurai K, Yahata K, Maruo F, Toyama F, Chiba C.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Novel erythrocyte clumps revealed by an orphan gene <i>Newtic1</i> in circulating blood and regenerating limbs of the adult newt.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-25867-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hirofumi Yasumuro, Keisuke Sakurai, Fubito Toyama, Fumiaki Maruo, and Chikafumi Chiba	4. 巻 5
2. 論文標題 Implications of a multi-step trigger of retinal regeneration in the adult newt	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines5020025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Keiichi Kojima, Yuki Matsutani, Takahiro Yamashita, Masataka Yanagawa, Yasushi Imamoto, Yumiko Yamano, Akimori Wada, Osamu Hisatomi, Kanto Nishikawa, Keisuke Sakurai and Yoshinori Shichida	4. 巻 114
2. 論文標題 Adaptation of cone pigments found in green rods for scotopic vision through a single amino acid mutation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 5437-5442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1620010114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Keisuke Sakurai	4. 巻 34
2. 論文標題 Physiological Characteristics of Photoreceptors in the Lamprey, <i>Lethenteron japonicum</i> .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 326-330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs170044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 杉原亮歩、中川将司、堀江健生、櫻井啓輔
2. 発表標題 パッチクランプ法によるホヤ幼生光受容細胞のイオンチャネル解析
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中智行、櫻井啓輔
2. 発表標題 時空間モデルを用いた視細胞の細胞形態と光応答の連関解析
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井啓輔
2. 発表標題 マウスモデル及び数理モデルによる視細胞の光応答特性の検証
3. 学会等名 異分野融合による次世代光生物学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉原亮歩、中川将司、堀江健生、櫻井啓輔
2. 発表標題 ホヤ幼生光受容細胞におけるイオンチャネル解析
3. 学会等名 異分野融合による次世代光生物学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉原堯歩、中川将司、堀江健生、櫻井啓輔
2. 発表標題 Patch clamp recordings from photoreceptors in ascidian larva
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第40回神戸大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keisuke Sakurai
2. 発表標題 Morphological and molecular basis of photoreceptor ability for photon detection.
3. 学会等名 International Symposium "Biophysics of Rhodopsins" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考