

視細胞における明順応の分子機構

Molecular mechanism of photoreceptor light-adaptation

代表研究者	慶応義塾大学医学部助教授 Assoc. Prof., School of Medicine, Keio Univ. Satoru KAWAMURA	河村 悟
協同研究者	東邦大学医学部助教授 Assoc. Prof., School of Medicine, Toho Univ. Ken TAKAMATSU	高松 研

Vertebrate photoreceptors respond to light by hyperpolarizing the membrane potential. Photoreceptors not only detect the on-and-off of the light, but also adapt to environmental light condition. Recent electrophysiological study showed that light-induced calcium concentration decrease is the underlying mechanism of photoreceptor light-adaptation.

The hyperpolarizing light response is generated by hydrolysis of cGMP, the second messenger in the vertebrate photoreceptors. It would be reasonable to think that adaptation is achieved by modification of the biochemical pathway, known as cGMP cascade, that leads to hydrolysis of cGMP. Therefore, one could expect that calcium influences the cascade.

During the course of experiment in which a frog rod was intracellularly perfused with a solution supplemented with cGMP, I realized that calcium affects cGMP phosphodiesterase (PDE), the hydrolyzing enzyme of cGMP. The calcium effect on PDE seemed to be mediated by a protein that binds to disk membranes at high calcium concentrations. Taking advantage of this binding, I purified the protein and named it S-modulin (sensitivity-modulating protein). S-Modulin increases light sensitivity of PDE at high calcium concentrations which is the condition attained during dark-adaptation. Therefore, it increases light sensitivity of a photoreceptor in the dark.

S-Modulin has EF hand structures and therefore belongs to calmodulin family. The relative molecular mass of S-modulin is 26 kD on an SDS-gel electrophoresis, and the mass calculated from its amino acid sequence is 23,522. We developed a simple method for purification of S-modulin which utilizes Phenyl Sepharose and DEAE column chromatography.

The site of S-modulin action was found to be rhodopsin phosphorylation that is responsible for inactivation of light-activated rhodopsin. An S-modulin-like protein, recoverin, has been found in bovine rods. Originally, recoverin was postulated as the calcium-dependent activator of the guanylate cyclase. However, at high calcium concentrations, this protein also increased PDE light-sensitivity and inhibited rhodopsin phosphorylation as S-modulin does. From these results, I concluded that recoverin is bovine S-modulin.

研究目的

視覚は、視物質が光を吸収して視細胞に電気的変化(視細胞電位; 過分極性の電位)が発生することから始まる。視細胞は内節と外節とから成り立っている(図 1a)。視細胞におけるこの光-電気信号変換を担う細胞内情報伝達機構(図 1b)は外節に存在する。この変換機構のセカンドメッセン

ジャーは cGMP であり、視細胞の原形質膜には cGMP が結合すると開くイオンチャネル(cGMP 依存性チャネル; 図 1b, a1)が存在する。暗時には cGMP の細胞内濃度が高くこのチャネルは開いており、陽イオンを透過し、電流が細胞内へ流入している。視物質は円板膜に存在し、光を吸収すると活性型となり、それが引き金となって

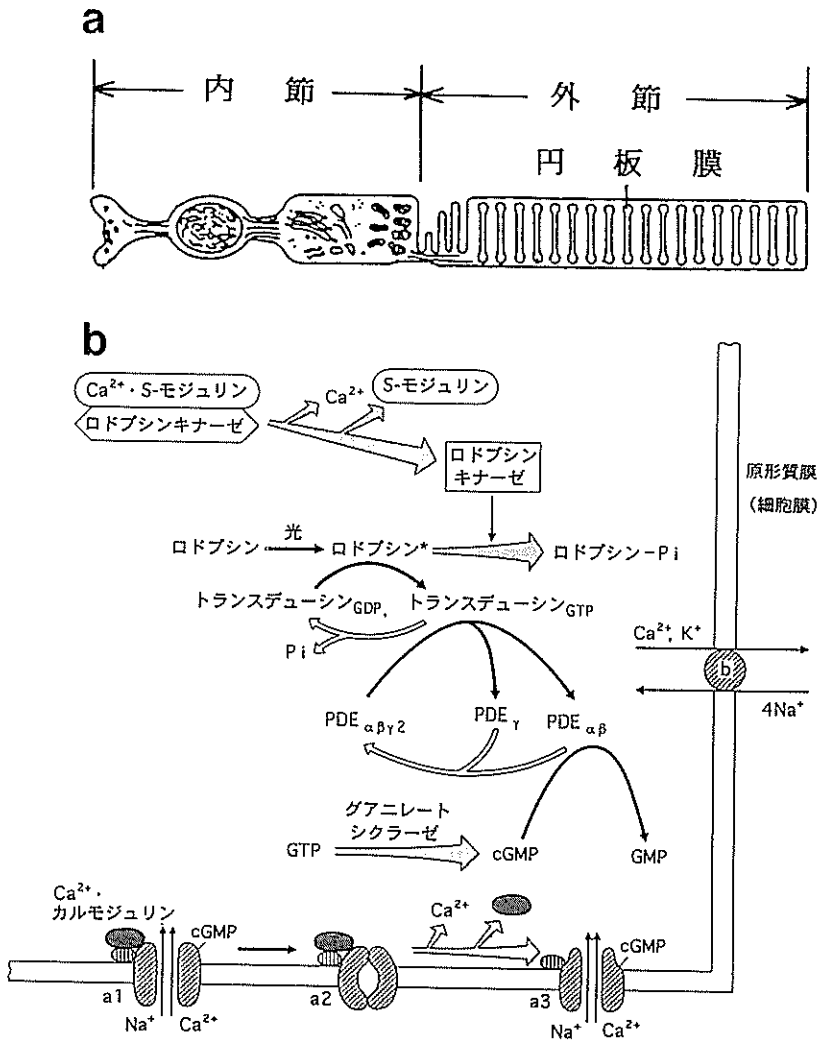


図1. 桿体視細胞の成り立ち (a) と、外節における光-電位変換機構 (b)

GTP 結合蛋白質であるトランスデューシンが活性化され、次いで cGMP ホスホジエステラーゼ (PDE) が活性化される。以上の反応は円板膜上で進行する。結局、視細胞が光を吸収すると PDE が活性化されるので cGMP が分解され、チャンネルから cGMP が外れてチャンネルが閉じる (a2)。暗時には内向きに流れていた電流が止まるので、細胞内は暗時に比べてより負の電位になる。これが視細胞電位の発生機構である。光照射が終われば cGMP は暗時のレベルまで回復し、それに伴い電位も回復する。

視細胞は単なる光検出器ではなく、周囲の光条件に応じて順応現象を示す。例えば明順応時には光感度が低下する。このような順応機能は種々の光条件下で常に最適な機能を発揮するように生物が獲得した特質であり、その生物の生存に非常に大きな意味を持つが、これまでは現象の記述にとどまり、分子レベルでのメカニズムの研究はあまり進んでいない。

冒頭で述べたように、視細胞内の電位は細胞内 cGMP 濃度に依存する。したがって、順応現象は cGMP の分解および合成が順応状態によって調

節されることによると考えられる。最近の研究によって、視細胞の順応には細胞内 Ca^{2+} が主要な働きをすることが明らかになってきた。すなわち、明順応したときの細胞内 Ca^{2+} 濃度は暗順応時より低く、このような視細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下が起こらないようにすると、視細胞は順応を起こさないことが示された。以上のことから、 Ca^{2+} 濃度が低下することにより、cGMP の分解、または合成が制御され、順応が生じていると考えることができる。

筆者は既に、 Ca^{2+} 依存的に cGMP の分解を制御すると推定される蛋白質の存在を示唆する結果を得ており、本研究では、この蛋白質の精製、および、生理機能、作用機能を明らかにすることを通じて、視細胞での順応機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

研究経過

研究成果については、次項の、「研究成果」の項で詳細に述べるが、本研究の経過の概略について、まず簡単に時間の経過に従って述べる。

本助成による研究を開始するまでに、報告者は電気生理学的な研究によって、カエル桿体外節には Ca^{2+} 濃度依存的に PDE の光活性化の効率を制御する蛋白質が存在することを示唆する結果を得ていた（助成申請書では A 蛋白と呼んでいた。後に S-モジュリンと命名したので以下ではこのように呼ぶことにする；後述）。そこでまず、S-モジュリンの精製を試みた。精製した S-モジュリンは PDE の光活性化の効率を Ca^{2+} 濃度依存的に制御した（論文リスト 1, 2）。次いで、精製方法の改良を行い、大量にしかも容易に S-モジュリンを得る方法を確立した（論文 3）。この方法によって得た試料を使って、S-モジュリンの諸性質を検討し、S-モジュリンが Ca^{2+} 結合蛋白質であることなどを明らかにした（論文 3）。さらに、S-モジュリンの作用機構を検討した結果、S-モジュリンは受容体である視物質のリン酸化を、高 Ca^{2+} 濃度で阻害することが明らかになった。この研究によって、視細胞の順応の分子機構が解明された（論文 4）。

報告者が S-モジュリンの存在を報告してのち、

米国のグループがウシの網膜から S-モジュリン様の蛋白質を分離し、リカバリンと命名した。リカバリンは S-モジュリンとは異なる機能をもつとして報告され、以後、S-モジュリンとの関係が論議を呼んでいた。報告者は、リカバリンも S-モジュリンと同じ生理作用を持ち、アミノ酸の一次配列も似ていることを明らかにし、リカバリンはウシの S-モジュリンそのものであることを結論した（論文 5）。最近米国のグループ自身が誤りを認め、報告者の得た結果の方が正しかったことが確定した。

S-モジュリンの精製を行う途上、S-モジュリンと似ているが、明らかに別である蛋白質 s26 を見いだした（論文 2）。この蛋白質の存在する細胞や機能についてはこれから明らかにしていかなければならない。

研究成果

I. S-モジュリンの精製（論文 1, 2）

報告者は、カエル桿体の細胞質を外液で任意に灌流できる標本、inside-out rod outer segment (I/O ROS) を用いた電気生理学的な研究によって、カエル桿体には高 Ca^{2+} 濃度で PDE の光活性化の効率を高める蛋白質が存在することを示唆する結果を得た。しかし、細胞質をいったん低 Ca^{2+} 濃度の溶液で灌流すると不可逆的になり、 Ca^{2+} の効果は認められなくなってしまった。このことから、この蛋白質は高 Ca^{2+} 濃度で円板膜に結合し、PDE の光活性化を高め、低 Ca^{2+} 濃度では膜から外れて作用しなくなる性質があると考えた。もしこのような蛋白質が存在すると、I/O ROS では細胞質が外液で灌流されているため、いったん、膜からはずれたこの蛋白質は洗い流されてしまい、二度と Ca^{2+} の効果が観察できなくなると説明できる。

このような可能性を検討するため、カエル桿体外節より低 Ca^{2+} 条件下で水溶性蛋白質を調製し、これを不可逆的な変化を起こした標本に戻してみたところ、 Ca^{2+} の効果が部分的に回復した。その他の予備的な実験からも、上記の可能性を支持する結果が得られたので、そのような蛋白質の存在を確信し、精製することを試みた。

精製に当たっては、高 Ca^{2+} 条件下で円板膜に結合する性質を利用した。すなわち、まず、 Ca^{2+} 濃度を高く保ってカエル網膜から桿体外節を分離し、破碎した。この条件ではこの蛋白質は円板膜に結合していると考えられる。ついで遠心分離して得た膜画分を、高 Ca^{2+} 溶液で数回洗い、その都度遠心分離した。高 Ca^{2+} 溶液で充分洗った膜画分を、最後に低 Ca^{2+} 溶液で洗って遠心した。

このようにして得た上澄画分では、見かけの分子量が 26 kD である蛋白質が主要な蛋白質であった。この画分を DEAE セファデックスカラムにかけ、NaCl 濃度勾配による段階的な溶出を行ったところ 26 kD 蛋白は、20-40 mM NaCl で溶出されるものと 100 mM 以上の NaCl で溶出されるものとに区別された。量的には低い塩濃度で溶出されるものの方が圧倒的に多かった。この画分を濃縮して、PDE に対する作用を検討したところ、PDE の光活性化の効率を Ca^{2+} 濃度依存的に制御した。したがって、この蛋白質を S-モジュリン (S-modulin; sensitivity-modulating protein) と命名した。

II. S-モジュリンの精製方法の改良 (論文 3)

上記の方法で精製した S-モジュリンの収率は、おおよそ 10% であると推定された。以後の実験を行う上で、収率を上げることが必要不可欠であると考えたので精製方法の改良を試みた。

それまでの実験において、高 Ca^{2+} 濃度では S-モジュリンは、試験管壁やプラスチック製の遠心管に吸着し易いという印象を持っていたので、 Ca^{2+} と結合すると、恐らく疎水性部分が蛋白質表面に露出するのではないかと考えた。そこで、疎水性基を持つ担体を使って S-モジュリンを精製することを考えた。具体的にはフェニルセファロースカラムを用い、高 Ca^{2+} 条件下で S-モジュリンをフェニル基に結合させ、低 Ca^{2+} 溶液で溶出させた。このような方法によると、収量は 90% 以上であると推定できたので、以後の精製ではこの方法を用いた。

III. S-モジュリンの諸性質 (論文 3)

精製した S-モジュリンを使って、蛋白質化学的な性質と Ca^{2+} 依存的な円板膜への結合の性質を調

べた。その結果、S-モジュリンは Ca^{2+} 結合蛋白質であり、蛋白質分解酵素を作用させて得た消化断片のアミノ酸に EF ハンド構造が含まれていたことから、この蛋白質がカルモジュリンファミリーに属することが分かった。

S-モジュリンは高 Ca^{2+} 濃度で円板膜に結合する性質があることはすでに述べた。S-モジュリンの作用機構を明らかにする上で、円板膜に存在するターゲットを特定する必要があると考えたので、円板膜に種々の処理を施し、ターゲットに関する情報を得ることを試みた。

ターゲットは蛋白質であろうとまず想像したので、円板膜をプロテアーゼで処理した。このような円板膜には S-モジュリンは例え高 Ca^{2+} でも結合しないであろうと予想した。しかし、S-モジュリンはこのような円板膜に結合した。そこで脂質に結合する可能性が考えられたので、円板膜からクロロホルム/メタノールで脂質を抽出し、リポソームを作り、S-モジュリンの結合が起こるかどうかを検討した。その結果、S-モジュリンは高 Ca^{2+} 濃度でリポソームに結合した。このような実験から、ターゲットが脂質である可能性が大きいと考えた。そこで、円板膜の脂質を分解すれば結合は起こらないだろうと予想し、種々のリパーゼで円板膜を処理して結合の有無を検討した。予想に反し、S-モジュリンは高 Ca^{2+} 濃度でこれらの円板膜に結合した。さらに、市販の種々の脂質から作ったリポソームには結合しなかった。このような結果から、ターゲットが脂質であるとの結論も下せなかった。

以上の研究からはターゲットを特定することができず、 Ca^{2+} 依存的な円板膜への結合の機構は複雑であり、ターゲットを特定するにはさらに詳細な研究が必要であるとの結論に達した。

どのような Ca^{2+} 濃度で結合が起こるのかも検討したが、結合の解離定数は高く、半分結合するのに約 10 μM の Ca^{2+} 濃度が必要であることが分かった。

IV. S-モジュリンの作用機構 (論文 4)

S-モジュリンは PDE の最大酵素活性を変えずに、光感受性のみを変化させる。したがって、S-

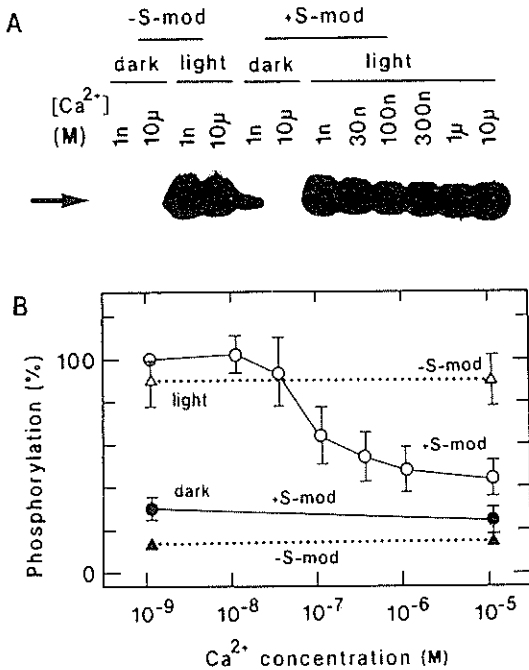


図2. 活性型視物質へのリン酸化に対する、Ca²⁺ 依存的な S-モジュリンの影響。
A. 活性型視物質へ取り込まれた ³²P。
B. 実測された放射活性。

モジュリンは光-電気信号変換機構のどこかに作用し、活性型物質の寿命を変えるか、反応の効率を変えるかのいずれかであろうと推察できた。そこでまず、Ca²⁺ 濃度依存的にトランスデューションへの GTP の結合が S-モジュリンによって調節されるか否かを検討した。しかし、この反応には S-モジュリンは影響を与えないとの結果を得た。(未発表)。

ついで活性型視物質の寿命に影響を与えるか否かを検討した。活性化された視物質はリン酸化されることによって不活性型へと転換する(図 1b 参照)。そこで、視物質へのリン酸化が S-モジュリンによって影響されるかどうかを検討した。その結果、S-モジュリンが存在している場合、高 Ca²⁺ 濃度では活性型視物質に生じるリン酸化の程度が低かった。一方、S-モジュリンを加えない場合、リン酸化の程度は高く、しかも Ca²⁺ 濃度には依存しなかった。(図 2)。したがって、S-モジュリンが存在するような生理的条件の場合、高

Ca²⁺ 濃度では活性型視物質の寿命が延び、その結果、PDE の活性化の効率が高くなると考えることができる。

高 Ca²⁺ 濃度でのリン酸化の阻害は、二つの機構で説明することが可能である。すなわち、高 Ca²⁺ 濃度でリン酸化反応自身が阻害される場合と、高 Ca²⁺ 濃度で脱リン酸化反応が活性化される場合とである。いずれであるのかを明らかにするために、低 Ca²⁺ 濃度であらかじめ十分に視物質をリン酸化させておき、その後 Ca²⁺ 濃度を上げた。もし、高 Ca²⁺ 濃度で脱リン酸化が活性化されるものであれば、リン酸化の程度は減少するはずである。しかし、リン酸化の程度は変化しなかった。一方、高 Ca²⁺ 濃度で中途半端にしかリン酸化させなかった場合、Ca²⁺ 濃度を低下させるとリン酸化の程度は増大した。これらの結果から、S-モジュリンは高 Ca²⁺ 濃度で脱リン酸化を促進するのではなく、リン酸化反応を阻害することが明らかになった。

以上の結果から、順応に関して次のような分子機構が考えられる。暗順応した桿体では細胞内の Ca²⁺ 濃度は比較的高い。このような条件のもとで視細胞に光が当たると視物質は活性化されるが、リン酸化反応が阻害されているのでリン酸化の程度は低く、活性型視物質の寿命は長い。したがって、トランスデューションの活性化と PDE の活性化の効率が高くなるので、cGMP の分解量も多くなり、視細胞の光感受性が高い。光刺激が持続し、細胞内 Ca²⁺ 濃度が減少すると、活性型視物質へのリン酸化の阻害が取り除かれ、活性型視物質は速やかに不活性型となる。したがって、暗順応時と同じ強度の光が当たっても、PDE の活性化の効率が低く、cGMP の分解量は暗順応したときよりも少ない。つまり、視細胞の光感受性は低く、これが明順応の状態である。以上により、順応の分子機構を説明できる。

V. リカバリンの生理作用(論文 5)

報告者が S-モジュリンの存在を発表してちょうど 1 か月後、米国のグループが分子量が 26 kD である Ca²⁺ 結合蛋白質をウシの桿体から精製した [Dizhoor *et al.*, *Science*, 251: 915-918

(1991)]. この蛋白質は分子量や Ca^{2+} 結合性から S-モジュリンと似た蛋白質であると言ってきた。しかし、報告者の結果とは異なり、この蛋白質はグアニレートサイクレスを低 Ca^{2+} 濃度下で活性化する蛋白質として発表された。このような作用は視細胞電位の回復 (recovery) を促進と考えられることから、リカバリン (recoverin) と命名された。S-モジュリンとリカバリンの関係については、①両者は異なる蛋白質である。②同一の蛋白質が異なる二つの機能を果たす、③両者は同一の蛋白質であるが、報告者と米国のグループのいずれかが間違っている、の三つの可能性が指摘され、論議を呼んでいた。

S-モジュリンとリカバリンの両者を比較検討すると、両者は同じ蛋白質で、見いだされた動物が異なるだけである可能性が高いと報告者は考えた。そこでリカバリンが PDE の光活性化の効率を Ca^{2+} 依存性に制御するか否か、視物質のリン酸化を Ca^{2+} 依存的に制御するか否かの 2 点を検討した。その結果、リカバリンは S-モジュリンと同様にこれらを Ca^{2+} 濃度依存的に制御した。さらに、S-モジュリンの全アミノ酸配列を決定し、リカバリンの全アミノ酸配列と比較した結果、80%以上の同一性があることが明らかになった。以上の結果からリカバリンは S-モジュリンそのものであり、PDE の光感受性を制御すると結論した。後日、米国のグループから、彼らの誤りを認める報告がなされた [Hurley *et al.*, *Science*, 260: 740 (1993)]。

VI. s26 の存在 (論文 2)

S-モジュリンを精製する途上、DEAE セファデックスから溶出する 26 kD 蛋白質のうち、NaCl 濃度が 100 mM 以上で溶出されるものがあることをすでに述べた。この物質は見かけの分子量が S-モジュリンよりも少し小さく、したがって、便宜上、small 26 kD protein (s26) と命名した。消化断片からアミノ酸の一次配列をいくつか決定しているが (Tokunaga, Kawamura *et al.*, 未発表) S-モジュリンとはアミノ酸配列においても異なる蛋白質である。しかし、現在のところ、この蛋白質がどの細胞に発現されているのか、ま

た、その生理作用は何かについては明らかでない。

今後の課題と発展

本研究によって視細胞における順応の分子機構が明らかになった。しかし、本研究によって、 Ca^{2+} を結合した S-モジュリンがどのような機構によって視物質のリン酸化を制御するのかという、新たな問題点が明らかになってきた。以下に述べる理由によって、この研究もこれから深く追求しなければならないと考えている。

これまで多くの研究者が指摘しているように、細胞による刺激受容機構には普遍性が認められる。S-モジュリンは刺激受容を調節する因子として報告者が初めて見いだした物質であり、これから研究が進展するに従い、多くの臓器、器官で類似物質が見いだされると思われる。事実、共同研究者が見いだしたように (論文 9)、海馬に特異的に発現している S-モジュリン様物質、等の報告が最近相次いでいる。しかし、これまでのところ、これら S-モジュリン類似物質で機能が明らかになっている例は一例も無い。視細胞は単一の細胞種として容易に分離ができること、刺激としての光は容易に制御でき、したがって厳密に刺激条件を設定できることなどの利点を有しており、刺激受容、および、その調節機構の研究は最も進んでいる (総説 1)。したがって、多くの他領域の研究者が視細胞での研究を参考に、自身の研究を進めている例は非常に多い。

このような現状から、S-モジュリンに関する上記の新たな研究を進展させることは、単に視覚の研究にとどまらず、他分野の研究の発展に寄与するところが大きい。また、S-モジュリンに対する抗体が異常に増加する結果視細胞が崩壊し、盲目になる疾病も報告されており [Polans *et al.*, *J. Cell Sci.*, 112: 981-989 (1991)], S-モジュリン作用の詳細な機構が明らかになれば、この疾病のメカニズムも明らかになる可能性がある。

さらにもう一点今後の課題として、報告者自身が関与したいと考えているのは、網膜の他の細胞、あるいは他の感覚系において S-モジュリンと同様の物質が存在するか否かである。冒頭でも述

べたように、脊椎動物の視細胞は光を受けると過分極する。無脊椎動物の視細胞、および、脊椎動物でも他の感覚受容細胞では刺激を受容すると逆に脱分極する。したがって、刺激に対する応答という観点からみると脊椎動物の視細胞は例外に属する。網膜の他の細胞、さらに、他の感覚器でS-モジュリン様物質が存在するとすれば（その可能性は高いと考えている。例えばs26）、その作用は視物質の場合とは異なっていることも考えられる。したがって、視細胞以外にS-モジュリン様物質が存在するか否か、その生理作用は何か、どのような作用機構なのかを研究することは、視細胞での研究以上に重要であるとも言える。S-モジュリン作用の普遍性を考える上で、是非明らかにしたい点である。

発表論文リスト（本助成による研究のみ）

【原著論文】

- 1) Kawamura, S., and Murakami, M.: Calcium-dependent regulation of cyclic GMP phosphodiesterase by a protein from frog retinal rods. *Nature*, 349: 420-423 (1991).
- 2) Kawamura, S.: Light-sensitivity modulating protein in frog rods. *Photochem. Photobiol.*, 56: 1173-1180 (1992).
- 3) Kawamura, S., Takamatsu, K., and Kitamura, K.: Purification and characterization of S-modulin, a calcium-dependent regulator on cGMP phosphodiesterase in frog rod photoreceptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186: 411-417 (1992).
- 4) Kawamura, S.: Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cGMP phosphodiesterase

regulation by S-modulin. *Nature*, 362: 855-857 (1993).

- 5) Kawamura, S., Hisatomi, O., Kayada, S., Tokunaga, F., and Kuo, C.-H.: Recoverin has S-modulin activity in frog rods. *J. Biol. Chem.*, 268: 14579-14582 (1993).
- 6) Takamatsu, K., Kitamura, K., and Noguchi, T.: Isolation and characterization of recoverin-like Ca^{2+} -binding protein from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183: 245-251 (1992).
- 7) Takamatsu, K., and Uyemura, K.: Identification of recoverin-like immunoreactivity in mouse brain. *Brain Res.*, 571: 350-353 (1992).
- 8) Takamatsu, K., Kobayashi, M., and Noguchi, T.: Immunohistochemical localization of recoverin-like Ca^{2+} -binding protein (p23k) in mouse brain. *Acta Histo. Cyto.*, 25: 533-536 (1992).
- 9) Kobayashi, M., Takamatsu, K., Saitoh, S., Miura, M., and Noguchi, T.: Molecular cloning of hippocalcin, a novel calcium-binding protein of the recoverin family exclusively expressed in hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189: 511-517 (1992).

【総説】

- 1) Kawamura, S.: Molecular aspects of photoreceptor adaptation in vertebrate retina. *International Review of Neurobiology*, 35: 43-86 (1993).
- 2) 河村 悟: 視細胞における明順応の分子機構. *科学*, 63, 303-311 (1993).
- 3) 河村 悟: S-モジュリン. *生体の科学*, 44, 247-248 (1993).
- 4) 河村 悟: 視細胞の順応とカルシウム結合蛋白質. *Clinical Calcium*, 3, 1476-1480 (1993).