

氏 名	さくら い けい すけ 櫻 井 啓 輔
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3199 号
学位授与の日付	平 成 19 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	視物質改変マウスモデルを用いた視覚機能多様性に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 七 田 芳 則 教 授 藤 吉 好 則 教 授 平 野 丈 夫

論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の網膜には2種類の視細胞、桿体と錐体が存在し、それぞれ、薄明視、昼間視を担っている。両視細胞の光応答特性は異なり、これは、同じ機能を持つ異なる性質を持つシグナル伝達タンパク質が両視細胞に存在するためと考えられている。一方、それぞれのタンパク質の性質の違いがどのような視細胞応答の違いを引き起こすかについての詳細な解析は行われていない。そこで、本研究では、桿体視細胞の応答特性に果たす視物質の役割を明らかにすることを目的とした。そのために、桿体の視物質ロドプシンの遺伝子座にマウス緑色感受性錐体視物質（以下、マウス緑）遺伝子を導入し、ロドプシンのかわりにマウス緑を含む桿体視細胞を持つノックインマウスを作製し、その桿体視細胞の応答特性を解析した。桿体視細胞に異所発現させたマウス緑の発現量はロドプシンの約11%であったが、ロドプシンと同様に桿体外節に局在することが確認された。

吸引電極法を用いて野生型ロドプシンあるいはマウス緑を含む視細胞の応答を比較した。その結果、光感度や単一光子応答（細胞内の1個の視物質が光反応したときに生ずる応答）の振幅は、野生型に比べてマウス緑ホモ体の方が3～4倍小さいことが分かった。一方、光応答のピークに達するまでの時間や回復の時間プロファイルに関しては両方で顕著な違いがみられなかった。したがって、ロドプシンとマウス緑の性質の違いは、ピークに達するまでの光シグナルの増幅過程に影響を与えることが示唆された。なお、マウス緑ホモ体の桿体視細胞はマウスの成長とともに変性することがわかり、この変性により実験結果が影響されることが考えられた。そこで、桿体視細胞の変性をおこさないマウスヘテロ体を利用して検討することを試みた。実験的には、野生型のロドプシンと波長感受性のみが異なるロドプシンE122Q変異体（ $\lambda_{\max} = 487\text{ nm}$ ）とマウス緑（ $\lambda_{\max} = 510\text{ nm}$ ）の両方を同一視細胞に含むマウスヘテロ体を用いて、両視物質に由来する単一光応答の振幅を比較した。その結果、マウス緑に由来する単一光応答の振幅の大きさは、野生型ロドプシンの0.31倍と見積もられた。マウス緑とロドプシンの違いはホモ体を用いて得られた違いと一致する。

次に、ノイズ解析の手法を用いて桿体視細胞におけるマウス緑の自発的活性化の頻度を測定した。その結果、頻度は $1.7 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ と求められ、この値は、ロドプシンより860倍高いことが分かった。

以上のことから、ロドプシンの代わりにマウス緑を発現させた桿体視細胞では、視物質の性質の違いによって光感度が約30%に低下し、また、マウス緑の高頻度な自発的活性化のため、桿体の単一光子検出能が著しく損なわれることが推定された。つまり、本研究により、桿体視細胞が単一光子計測能を獲得する上で、視物質の「高効率な増幅効率」と「暗状態での高い熱安定性」が重要なファクターであることが明らかになった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

我々の眼のダイナミックレンジは 10^9 あることが知られているが、これは、ヒトを含めた脊椎動物の眼に桿体、錐体と呼ばれる2種類の視細胞が存在し、それぞれが分担して働いているためである。両視細胞の応答特性は大きく異なるが、これ

までの研究により、両視細胞には同じ機能を持つが異なる分子特性をもつシグナル伝達蛋白質が存在することが明らかになってきた。したがって、両視細胞の応答特性の違いは、それぞれの機能性蛋白質の分子特性の違いであると考えられ、生化学的な研究によりそれぞれの機能性蛋白質の分子特性が検討されてきた。しかし、視細胞の応答特性がどの機能性蛋白質の分子特性の違いと連関しているかは、実際に視細胞内で機能性蛋白質を置換するなどして検討することが必要となる。本研究は、この研究方向に従って、マウスのロドプシン遺伝子座にマウスの緑色感受性錐体視物質（以下、マウス緑と略称）の遺伝子を導入したノックインマウスを作製し、その桿体視細胞の応答特性を実験的に検討したものである。

実験の結果、本来の桿体視細胞の視物質であるロドプシンをマウス緑に置換すると、ロドプシンに由来する桿体視細胞の電気応答が約1/3に減少し、また、ロドプシンが発生する暗ノイズに比べてマウス緑からは約860倍の暗ノイズが発生することを発見した。以上のことから、単一光子検出器として進化の究極にある桿体視細胞の応答特性にロドプシンの分子特性が密接に関与していることがわかった。なお、本研究の遂行にあたって、マウスホモ体で観察される視細胞の変性による実験結果への影響を、変性のおこらないマウスヘテロ体を用いて検証することを試み、ヘテロ体での実験結果を詳細に解析することにより、目的を達成したことは高く評価される。

本研究により、視細胞の生理的応答と機能性蛋白質の分子特性との連関について、実験的なアプローチの仕方が提案された。また、視細胞応答に直接関与する視物質の分子特性が実験的に直接解析されたことにより、この分野における機能解析研究が大きく発展すると期待される。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものを認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。