

フタホシコオロギ網膜におけるビタミンA代謝系の解明

尾崎浩一・大島朗伸

目 的

視細胞において最初に光を吸収し、細胞内信号伝達の引き金となるのが視物質である。視物質は蛋白質部分であるオプシンと、発色団である 11-*cis* レチナールからできており、視物質が光を吸収すると発色団は all-*trans* 形に異性化され、その後のオプシンの構造変化を誘導する。また、生じた all-*trans* レチナールは、再び 11-*cis* 形に戻されてオプシンと結合し、視物質合成に再利用される。この 11-*cis* レチナール再生のための代謝経路は visual cycle と呼ばれており、視覚機能を維持する上で極めて重要な役割を担っていることから、さかんに研究が行われてきた。その結果、脊椎動物に関しては、レチノイドの異性化に携わる酵素や、細胞内、細胞間でのレチノイド輸送に関わる結合蛋白質などが次々と見出され、visual cycle の全容がほぼ明らかとなっている (Kiser et al., 2012)。一方、無脊椎動物の visual cycle に関しては、軟体動物のレチナール光異性化蛋白質やレチナール結合蛋白質の発見、ショウジョウバエにおける種々のレチノイド代謝関連タンパク質変異体の解析など、いくつかの先駆的な研究がなされてきたにもかかわらず、その代謝様式の多様性から全容の解明に至っているものはない (尾崎, 2008)。

我々は、従来、キロショウジョウバエを中心に昆虫の visual cycle に関する研究を行ってきた。ショウジョウバエは、飼育条件の制御の容易さや種々の変異体の活用など多くの利点を持っている。しかし、発色団レチナールが他の多くの動物とは異なる 3-ヒドロキシ型であり、代謝経路に構造異性が関与する複雑な反応を含むことから、この動物を用いて visual cycle の全般的な解明を行うには困難が伴うことが予想されていた (Seki et al., 1998)。一方、フタホシコオロギは、高度な視覚系を有し、生理や行動の研究にも頻用される昆虫で、我々と同様の通常型レチナールを発色団としている。また、最近では、RNAi の効果的な活用やゲノム解読の進展も報告されており (Miyawaki et al., 2004)、昆虫の visual cycle の研究には最適の実験系であると考えられた。そこで本研究では、フタホシコオロギを昆虫網膜におけるビタミン A 代謝研究のモデル実験系として確立するため、明暗各順応条件下でのレチノイド組成の分析と、代謝経路において特に重要な役割を果たす「ビタミン A 結合蛋白質」の同定、その生体内での機能の解明を目的とした。

材料と方法

フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) はブリーダーから購入し、実験室 (気温 25 - 28°C, 12L12D) で一週間から 1 ヶ月間飼育した後使用した。実験直前には 72 時間の暗順応を行い、光照射は、昼光色蛍光灯 (1.25×10⁵ lux) により行った。

暗順応または光照射したコオロギから暗赤色光下で眼を切り出し、オキシム法によりレチノイドを抽出した。抽出したレチノイドは、順相 HPLC によりその組成を分析した。

レチノール結合蛋白質は、暗順応した眼から抽出し、SMART System を用いた陰イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。精製蛋白質について、SDS-PAGE で純度を調べるとともに、ネイティブ PAGE および HPLC 分析により、結合するレチノイドを解析した。

精製したレチノール結合蛋白質を SDS-PAGE に流し、当該蛋白質のバンドを含むゲル片を切り出した。このゲル片をトリプシン処理し、生じたペプチドを抽出・回収した。抽出液を逆相 HPLC に流してペプチドを分離し、主要な 2 つのピークを回収してペプチドシーケンスを行った。

結果と考察

1. コオロギの visual cycle

暗順応したコオロギの眼のレチノイド組成比は、およそ 11-*cis* レチナール : all-*trans* レチナール : all-*trans* レチノール = 6 : 1 : 3 であった。このコオロギに白色光を 1 時間照射すると、レチナールが 11-*cis* 形から all-*trans* 形に異性化するとともに、all-*trans* レチノールが減少し代わって 11-*cis* レチノールが出現した。更に光照射後のコオロギを再び暗所で飼育すると、光照射により生成した 11-*cis* レチノールが減少し、11-*cis* レチナールが増加することも分かった。以上の結果から、暗順応したコオロギの眼には、視物質発色団として存在するレチナールに加え、all-*trans* レチノールが貯蔵されていること、このレチノールは光により 11-*cis* 形に異性化され、更に酸化反応によりレチナールとなって視物質発色団として利用されることが示唆された。これは、コオロギの visual cycle において、レチノールの光異性化が重要な役割を果たす可能性が高いことを示している。

2. レチノール結合タンパク質

上記のレチノールが眼の何処に存在するかを明らかにするため、眼のホモジネートを水溶性と膜の2つの画分に分け、レチノイド分析を行った。その結果、レチノールが膜画分に局在するのに対し、レチノールはどの異性体も専ら水溶性画分に存在することが分かった。

レチノール自身は疎水性が高いため、水溶性画分では何らかの結合蛋白質に結合して存在する可能性が高いと考えられた。そこで、眼の水溶性画分について陰イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーを行い、レチノールを結合する蛋白質を精製することに成功した。この蛋白質の分子量は約33k (SDS-PAGE) で、暗順応した眼から抽出した場合には all-*trans* 形の、照射後の眼から抽出した場合には主に 11-*cis* 形のレチノールを結合していた。更に、all-*trans* 形を結合した精製蛋白質に、試験管内で UV 光を照射すると、結合したレチノールが専ら 11-*cis* 形に異性化されることが明らかとなった。以上の結果から、このレチノール結合蛋白質が、コオロギの眼で起こるレチノールの all-*trans* 形から 11-*cis* 形への光異性化に関与していることが強く示唆された。

精製したレチノール結合蛋白質をペプチドに分解し、そのうちの3種のペプチドについて部分アミノ酸配列を決定することに成功した。得られた配列をもとに BLAST 検索を行ったが、既知の蛋白質の相同性は検出されなかつ

たことから、今後は、このアミノ酸配列を基に、蛋白質の全一次構造を決定する予定である。

引用文献

- Kiser, P. D., Golczak, M., Maeda, A. and Palczewski, K. (2012) Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina. *Biochim. Biophys. Acta*, **1821**: 137-151.
- Miyawaki, K., Mito, T., Sarashina, I., Zhang, H., Shinmyo, Y., Ohuchi, H. and Noji, S. (2004) Involvement of Wingless/Armadillo signaling in the posterior sequential segmentation in the cricket, *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera), as revealed by RNAi analysis. *Mech. Dev.*, **121**: 119-130.
- 尾崎浩一 (2008) 視物質の合成とレチノイドの輸送・代謝. *蛋白質 核酸 酵素*, **53**: 132-138.
- Seki, T., Isono, K., Ozaki, K., Tsukahara, Y., Shibata-Katsuta, Y., Ito, M., Irie, T. and Katagiri, M. (1998) The metabolic pathway of visual pigment chromophore formation in *Drosophila melanogaster*. All-*trans* (3S)-3-hydroxyretinal is formed from all-*trans* retinal via (3R)-3-hydroxyretinal in the dark. *Eur. J. Biochem.*, **257**: 522-527.