

論文の内容の要旨

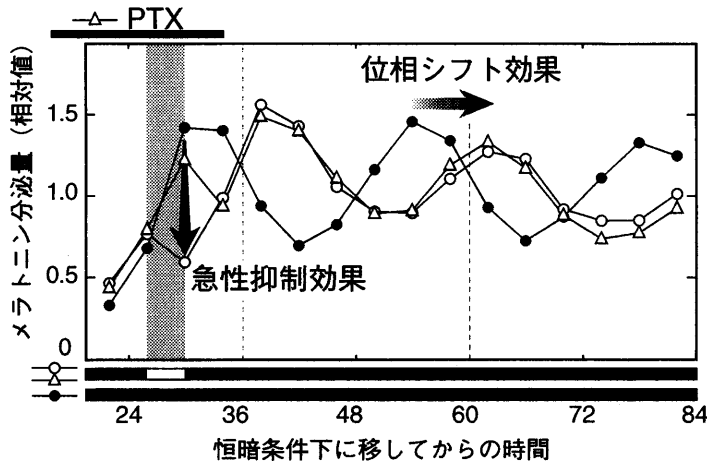
Dual Phototransduction Pathways in the Chicken Pineal Cell (ニワトリ松果体細胞における光情報伝達経路の解析)

笠原 和起

地球上のほとんどすべての生物は、活動や生理機能に1日周期の変動を示すが、これらの変動の多くは生体内に存在する概日時計に駆動されている。概日時計は自律的に発振するものの、名前が示すように、その周期は概(おおむ)ね1日であって正確に24時間ではない。そのため、概日時計には、外界の明暗周期に同調するための光入力系がほぼ例外なく備わっている。ところが、脊椎動物においては、この光入力系に関わる光受容分子の実体すら未だに明らかになっていない。申請者は、この謎に包まれている概日時計の光入力系を分子レベルで探るため、ニワトリの松果体細胞を用いて研究を行った。

ニワトリ松果体細胞は、個々の細胞が概日時計の発振系と光入力系を持ち併せており、分散培養した状態においても、時計の時刻(位相)にしたがってメラトニンを周期的に分泌する。これらの特徴から、この細胞は概日時計の解析に適した材料として詳しく研究されてきた。当研究室において、ニワトリ松果体に特異的に発現する光受容タンパク質であるピノプシンが同定され、松果体の概日時計の位相調節を担う光受容分子ではないかと注目された。ピノプシンは、網膜の視物質と同様、ロドプシンファミリーに属するGタンパク質共役型受容体であることから、ピノプシンと共役しているGタンパク質を同定し、それを足がかりに光入力系を解析しようと考えた。1980年代に行われた先行研究から、光はこの細胞に対して2つの異なる効果を与えることが知られていた(図1)。ひとつは概日時計に入力して位相シフトを引き起こす効果(光位相シフト効果)で、もうひとつは時計を介さず直接にメラトニンの合成を急性に抑制する効果(急性抑制効果)である。これら2つの効果を導く経路は百日咳毒素(PTX)に対する感受性が異なり、急性抑制効果はPTXによって阻害されるが、光位相シフト効果は影響を受けない(図1)。このことから、PTXに対して感受性の異なる2種類のGタンパク質が光の2つの効果にそれぞれ関与しているであろうと推測し、研究を進めてきた。

はじめに、ニワトリ松果体に発現しているGタンパク質 α サブユニット($G\alpha$)を、遺伝子クローニングによって検索した。cDNAを単離すれば、推定アミノ酸配列からその $G\alpha$ がPTXによるADPリボシル化反応の



【図1】メラトニン分泌リズムに与える光の2つの異なる効果

ニワトリ松果体細胞を分散培養し、明暗周期に同調させた後、恒暗条件下に移した。4時間おきに培地を回収・交換し、培地中に含まれるメラトニン量を測定した。夜の前半に相当する時間帯に4時間の光照射を行った(○)。光照射とともにメラトニンの分泌は急性に減少し、さらに位相のシフトが観察された。また、光照射前26時間から照射後4時間の間、百日咳毒素(PTX)を投与した細胞では、2つの光効果のうち、急性の抑制効果のみが阻害された(△)。

基質になるかどうか推測することができるからである。網膜においてロドプシンが G タンパク質トランスデュシンと共役する際に相互作用する部位のアミノ酸残基が、特に高い割合でピノプシンにおいても保存されているため、トランスデュシン様の G α を中心に検索を行った。その結果、哺乳類の桿体視細胞に発現しているトランスデュシン α サブユニット(Gt $_1\alpha$)に高い相同性を示すタンパク質の全長 cDNA クローンが得られた。当時、鳥類のトランスデュシンの一次構造が報告されていなかったため、このタンパク質がニワトリ網膜のトランスデュシンと同一か否か判断できなかった。そこで、ニワトリ網膜から、桿体型および錐体型トランスデュシン(Gt $_1\alpha$ と Gt $_2\alpha$)をコードする cDNA をそれぞれ単離した。その結果、松果体に発現しているトランスデュシンは、Gt $_1\alpha$ と同一の分子であることが明らかになった。また、ニワトリ Gt $_1\alpha$ は、C 末端から 4 番目のアミノ酸残基がシステインのため、PTX 感受性の G α であると考えられた。

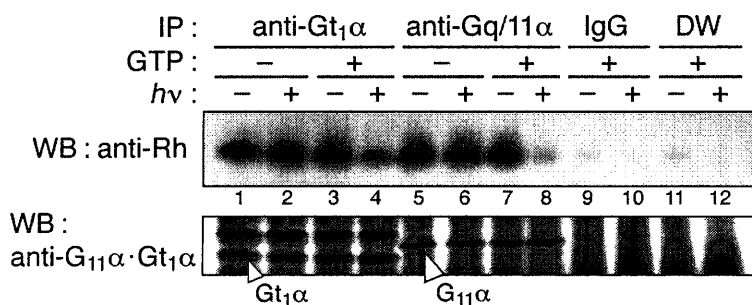
Gt $_1\alpha$ を含め、それまでにニワトリ松果体 cDNA ライブラリーから cDNA が単離されていた G α (Gi $_2\alpha$, Gi $_3\alpha$, Go $_1\alpha$, Go $_2\alpha$)は、いずれも PTX による ADP リボシル化部位を持っていた。したがって、これらはすべて、光位相シフト効果(PTX 非感受性)ではなく、むしろ急性抑制効果(PTX 感受性)に関与していると考えられた。このことから、上記 4 種類の G α に加えて PTX 非感受性の G α が松果体に発現しているに違いないと考え、それを探索した。ここで申請者は無脊椎動物の網膜における光情報伝達に着目した。なぜなら、無脊椎動物の視細胞においてロドプシンと共役している G α は Gq ファミリーに属し、PTX 非感受性であることが知られているからである。Gq ファミリーの G α (Gq α や G $_{11}\alpha$)に着目したのは、もうひとつの理由があった。種々の薬剤を用いた先行研究から、細胞内 Ca $^{2+}$ ストアからの Ca $^{2+}$ 動員がニワトリ松果体細胞において光と同様の位相シフトを引き起こすことが報告されていたからである。多種の細胞において、Gq/11 α (Gq α および G $_{11}\alpha$)はホスホリパーゼ C- β を活性化し、イノシトール三リン酸の産生を介して細胞内 Ca $^{2+}$ ストアからの Ca $^{2+}$ 動員を引き起こす。この経路がニワトリ松果体細胞に存在すれば、PTX の影響を受けない光入力系を構成し得ると考えた。そこで、Gq ファミリーの G α を増幅できるような縮重プライマーを用い、ニワトリ松果体 RNA に対して RT-PCR を行った。その結果、G $_{11}\alpha$ をコードする cDNA 断片が得られ、その配列をもとに 5'および 3' RACE 法を用いてコード領域全長の cDNA を単離した。ニワトリ G $_{11}\alpha$ は C 末端から 4 番目

のアミノ酸はチロシンで、PTX の基質とならないことが確認された。

次に、全長 cDNA が得られた 6 種類の $G\alpha$ ($G_{t1}\alpha$, $G_{11}\alpha$, $G_{i2}\alpha$, $G_{i3}\alpha$, $G_{o1}\alpha$, $G_{o2}\alpha$) のなかから、ピノプシンと共局在している $G\alpha$ を免疫組織化学的に検索した。すなわち、これらの $G\alpha$ に対する特異的抗体を用いてニワトリ松果体の切片を免疫染色し、ピノプシンが局在している濾胞内腔の膜構造体に陽性像が認められるかどうかを調べた。その結果、 $G_{t1}\alpha$ および $G_{11}\alpha$ を認識する抗体によって濾胞内腔の周辺が強く染色された。一方、その他の $G\alpha$ に対する抗体を用いた場合は、そのような特異的な染色像は得られなかった。これらの結果から、 $G_{t1}\alpha$ (PTX 感受性) と $G_{11}\alpha$ (PTX 非感受性) の 2 種類の $G\alpha$ がピノプシンと共存しており、ピノプシンから光情報を受け取り、急性抑制効果および位相シフト効果にそれぞれ寄与している可能性が示唆された。

$G_{t1}\alpha$ が松果体の光情報伝達を担っていることを機能的に明らかにするため、トリプシンプロテクションアッセイ法を松果体懸濁液に応用して調べた。この方法は、 $G_{t1}\alpha$ が不活性型 (GDP 結合型) から活性型 (GTP 結合型) に変化する際に、トリプシンによる消化部位が 1 つ消滅することを利用している。ニワトリ松果体懸濁液に GTP γ S を添加し、光を照射した。その後、トリプシンを加えて懸濁液中のタンパク質を消化し、ウエスタンブロットによって $G_{t1}\alpha$ のトリプシン消化断片を検出した。その結果、GTP γ S を加えた場合のみ、光刺激依存的に活性型 $G_{t1}\alpha$ の消化断片が検出された。このことから、松果体 $G_{t1}\alpha$ が松果体に存在する光受容タンパク質 (おそらくはピノプシン) によって活性化されたと考えられた。

また、脊椎動物のオプシンとの共役がこれまで全く知られていない $G_{11}\alpha$ に関しては、免疫沈降法を用いてオプシンとの相互作用を検出することを考えた。ニワトリ松果体に含まれるピノプシンは極めて微量で、十分な解析を行うことが困難であったため、ニワトリの網膜を材料に用いてロドプシンと $G_{11}\alpha$ の相互作用を調べた。暗順応させたニワトリ網膜の懸濁液から、抗 Gq/11 α 抗体によって $G_{11}\alpha$ を免疫沈降し、ロドプシンが共沈するか否かをウエスタンブロットにより解析した (図 2, レーン 5~8)。その結果、光照射を行わなかった懸濁液からはロドプシンが共沈したが、GTP を加えて光を照射した懸濁液からはほとんど共沈されなかった。つまり、 $G_{11}\alpha$ は暗の中ではロドプシンと会合しており、GTP 存在下において光依存的にロドプシンと解離すると考えられた。この $G_{11}\alpha$ の挙動 (レーン 5~8) と、ロドプシンとの共役がよく知られた $G_{t1}\alpha$ の挙動 (レーン 1~4) が極めて類似していることから、オプシン型光受容タンパク質はトランスデューシンだけで



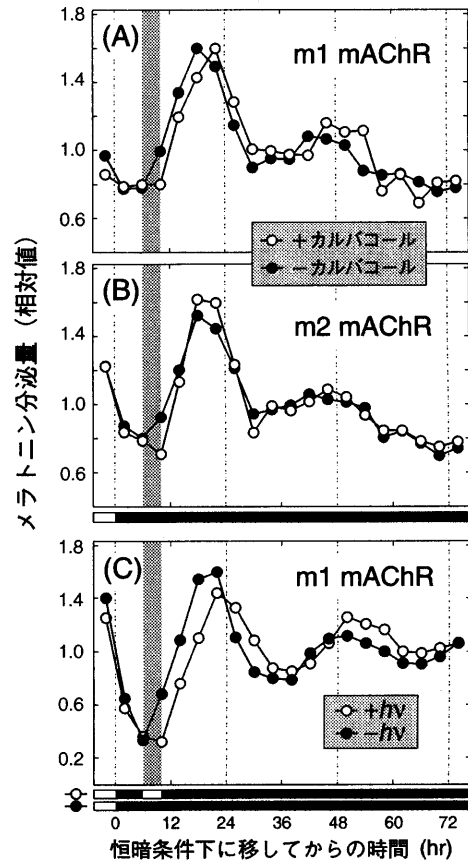
【図 2】 $G_{11}\alpha$ は脊椎動物のオプシンと機能的に相互作用する

暗順応させたニワトリ網膜から CHAPS 可溶化画分を調製し、GTP 存在/非存在下において光照射を行った。その懸濁液から、 $G_{t1}\alpha$ あるいは $G_{11}\alpha$ を認識する抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈したロドプシンをウエスタンブロットによって検出した (上)。その後、抗 $G_{11}\alpha$ 抗体と抗 $G_{t1}\alpha$ 抗体によってリブプローブした (下)。

なく $G_{11}\alpha$ とも共役していることが強く示唆された。

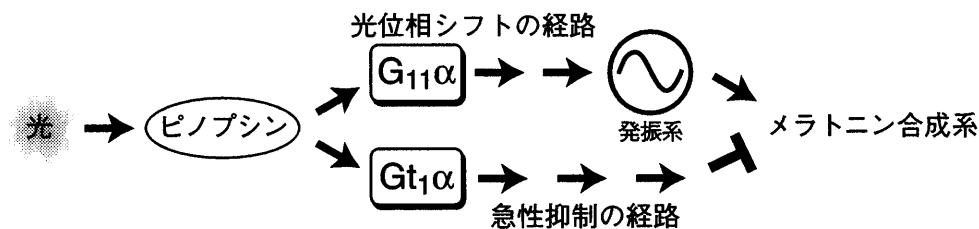
最後に、 $G_{11}\alpha$ を介する細胞内情報伝達経路が時計発振系に入力しているかどうか検討した(図3)。 $G_{11}\alpha$ を特異的に活性化するために、 $G_{11}\alpha$ と共役することが知られているムスカリン性アセチルコリン受容体 m1 サブタイプ(m1 mAChR)を初代培養したニワトリ松果体細胞に発現させた。恒暗条件下において mAChR のアゴニストであるカルバコールで刺激すると、光照射を行ったときと同様にメラトニン分泌リズムの位相がシフトした(図3A, C)。対照実験として $G_{i\alpha}$ や $G_{o\alpha}$ と共役する m2 mAChRを導入した場合は、カルバコール刺激を行ってもリズムの位相シフトは観察されなかった(図3B)。これらのことから、Gタンパク質共役型受容体から $G_{11}\alpha$ を介した伝達経路は概日時計の発振系に入力し、位相のシフトを引き起こすことが明らかになった。

以上の一連の実験結果から、ニワトリ松果体細胞において、ピノプシンは $G_{t1}\alpha$ と $G_{11}\alpha$ という2種類の $G\alpha$ と共役して光情報をそれぞれに伝達していると考えられた。網膜の桿体視細胞において視覚の初期過程を担っている $G_{t1}\alpha$ が、松果体細胞ではメラトニン分泌の急性抑制に関わっており(図4)、同一の遺伝子産物が異なる組織において異なる生体反応に利用されている極めて興味深い知見といえる。本研究はさらに、「ピノプシン- $G_{11}\alpha$ 」という新規の光情報伝達経路がニワトリ松果体細胞に存在し、概日時計の光入力系として働いていることを強く示唆した(図4)。脊椎動物における概日時計の光同調にかかわる光受容分子はこれまで謎であったが、ニワトリ松果体細胞においてはピノプシンがその分子(のひとつ)であることを初めて示すことができた。



【図3】 $G_{q/11}$ 共役型受容体の刺激は光照射と同様の位相シフトを引き起こす

分散培養したニワトリ松果体細胞に、ムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)のm1サブタイプ(A)またはm2サブタイプ(B)のcDNAをトランスフェクトした。プラスミドを持たない細胞を抗生物質によって死滅させた後、恒暗条件下においてカルバコールを4時間投与した。また、m1 mAChRを導入した細胞に4時間の光照射を行った(C)。



【図4】 ニワトリ松果体における2つの光情報伝達経路のモデル