

学位論文

RPE65 ノックアウトマウスにおける
錐体オプシンの翻訳後修飾異常

2010.9

岩手大学大学院 連合農学研究科
生物資源科学専攻 生物機能開発学連合講座
(弘前大学)

佐藤 孝太

目次

第 1 章 序論	
1-1 眼器官と網膜	1 頁
1-2 視細胞とオプシン	1 頁
1-3 視細胞と光伝達シグナル	2 頁
1-4 視サイクルにおける RPE65 と視機能	3 頁
1-5 視サイクル異常と網膜変性	4 頁
1-6 レチノイドとオプシン	5 頁
第 2 章 実験材料および実験方法	
2-1 実験動物	7 頁
2-2 RNA 抽出	7 頁
2-3 cDNA 合成	8 頁
2-4 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	8 頁
2-5 ウェスタンブロッティング	9 頁
2-6 凍結切片作製	10 頁
2-7 免疫組織化学	10 頁
2-8 網膜フラットマウント	11 頁
2-9 リアルタイム PCR を用いた半定量性 RT-PCR 法	11 頁
2-10 N-型糖鎖切断	12 頁
2-11 プロテアーゼ阻害剤およびレチノイド調整	12 頁
2-12 網膜培養	12 頁
2-13 ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色	13 頁
2-14 TdT-dUTP terminal nick-end labeling (TUNEL)	13 頁
2-15 電子顕微鏡	13 頁
2-16 統計解析	14 頁
第 3 章 実験結果	
3-1 RPE65 発現の確認	15 頁
3-2 <i>Rpe65</i> ^{-/-} マウスにおける錐体オプシンとロドプシンの局在	15 頁
3-3 <i>Rpe65</i> ^{-/-} マウスの網膜内における S-opsin の分布	15 頁
3-4 <i>Rpe65</i> ^{-/-} マウスにおける錐体オプシンおよびロドプシンの 遺伝子発現	16 頁

3-5	<i>Rpe65</i> ^{-/-} マウスにおける錐体オプシンおよびロドプシンのタンパク質発現	16頁
3-6	<i>Rpe65</i> ^{-/-} マウスにおける錐体オプシンの翻訳後修飾解析	17頁
3-7	網膜培養	18頁
3-8	培養 <i>Rpe65</i> ^{-/-} マウス網膜の M-opsin に対するプロテアーゼ阻害剤およびレチノイドの影響	19頁
3-9	<i>Rpe65</i> ^{-/-} マウスの微細形態観察	21頁
第4章 考察		
4-1	<i>Rpe65</i> ^{-/-} マウスにおけるオプシンタンパク質の成熟と局在	22頁
4-2	<i>Rpe65</i> ^{-/-} マウスにおける M-opsin タンパク質の分解	24頁
4-3	<i>Rpe65</i> ^{-/-} マウスにおけるロドプシンの発現機序	26頁
4-4	<i>Rpe65</i> ^{-/-} マウスにおける錐体細胞の変性様式	27頁
4-5	<i>Rpe65</i> ^{-/-} マウスにおける S-opsin の発現分布	28頁
4-6	総合考察	29頁
第5章 引用文献		31頁
図表		37頁
謝辞		61頁

1. 序論

1-1 眼器官と網膜

眼器官は外界に存在する光を情報として受容し、その刺激を脳内で視覚情報として処理することで視覚を形成する。外界の光は、眼球前部の透明な組織でありバリア機能を持つ角膜を通過し、屈折率を調節する水晶体を經由して最終的には中枢神経系の一部である神経網膜で像を結ぶ。網膜に到達した光は網膜深層に位置する視細胞により受容される。視細胞で受容された光刺激は電気刺激に変換され、双極細胞や水平細胞、アマクリン細胞などの二次ニューロンからガングリオン細胞を經由して脳の視覚中枢に伝わり、最終的に視覚が形成される。

1-2 視細胞とオプシン

視細胞には桿体細胞と錐体細胞の二種類が存在しており、桿体細胞と錐体細胞はそれぞれ異なった視物質をもつ。視物質は、タンパク質（オプシン）とビタミンA誘導体であり光を吸収する色素である発色団(11-*cis*-retinal)から成り、発色団はオプシン内のシッフ塩基と結合している。桿体細胞と錐体細胞の視物質における発色団は共通しているものの、発現しているオプシンの種類が異なるために、これらの視物質はそれぞれ異なった最大吸収波長を示す¹。マウス網膜において、桿体細胞ではロドプシン ($\lambda_{\max}=498\text{ nm}$)、錐体細胞では短波長感受性オプシン (short-wavelength sensitive opsin: S-opsin, $\lambda_{\max}=359\text{ nm}$) と中波長感受性オプシン (middle-wavelength sensitive opsin: M-opsin, $\lambda_{\max}=510\text{ nm}$) を視物質として発現している²。また、ロドプシンと錐体オプシンでは光感度が異なっており、ロドプシンは非常に高感度なためわずかな光子量でも活性化されるが、錐体オプシンはロドプシンよりも強い光強度で刺激されなければ活性化しない。視物質はこれらの特徴を持つため、桿体細胞は主に明暗を判断するための光覚を、錐体細胞は異なった波長吸収特性を持つことで色覚を担っている。

ロドプシンおよび錐体オプシンは、外節とよばれる視細胞に特徴的な構造体に密に充填されている。マウス網膜の場合、全視細胞のうち約 97%が桿体細胞であると言われており、そのため視細胞には非常に多くのロドプシンが存在している³。桿体細胞の外節には約 1000 枚の円盤状の構造が存在し、7 回膜貫通型であるロドプシンは一枚の円盤状構造あたり 10^4 から 10^6 個存在している⁴。

1-3 視細胞と光伝達シグナル

視覚形成において、視細胞による光受容とその後に発生する光伝達シグナルの開始が反応の第一段階となる⁵。視細胞は効率良く光受容をおこなうために外節という構造が発達しており、この部位に視物質を高密度に保持している。オプシンは発色団である 11-*cis*-retinal と結合することで視物質としての役割を果たす。暗条件において、11-*cis*-retinal の一方は β -イオン環と結合部位のアミノ酸側鎖によって形成される疎水性相互作用によって結合し、もう一方はオプシンの 7 番目の α ヘリックスに保存されているリジン残基の側鎖とシッフ塩基を形成して結合している^{6,7}。さらにこのシッフ塩基はプロトン化されている。プロトン化されたシッフ塩基は正電荷をもつため、シッフ塩基と対イオンを成すグルタミン酸との結合により安定に存在している⁸。視物質が光を受容すると、オプシンと複合体を形成していた 11-*cis*-retinal は光受容の際に all-*trans*-retinal に異性化される⁹。その際、G タンパク質共役型受容体であるオプシンの構造が変化し活性型となる。桿体細胞内に存在するロドプシンの場合、立体構造の変化は中間体であるバソルミロドプシン、メタロドプシン I、メタロドプシン II a をミリ秒単位で経過して、最終的に活性型であるメタロドプシン II b となる。活性型となるうえで重要なステップは、メタロドプシン I からメタロドプシン II a に移行する際にシッフ塩基のプロトンが対イオンであるグルタミン酸に受け渡されることで、異性化された all-*trans*-retinal とオプシンの結合が崩れてしまうことである⁷。メタロドプシン II b は、GDP が結合して不活性化されているトランスデュシンに結合し、GDP を GTP に置換する。これにより活性化状態となったトランスデュシンは、cGMP ホスホジエステラーゼの阻害性 γ サブユニットと結合する。これにより触媒活性をもったホスホジエステラーゼの α と β サブユニットは、cGMP を分解して 5'-GMP にする。これにより桿体細胞内で cGMP の濃度が下がると cGMP 依存性イオンチャネルが閉じ、膜が過分極することで電位差が生じ、神経伝達物質の放出が減る。この過程により光刺激が視細胞内で電気刺激に変換される¹⁰。これら一連の反応を光伝達シグナルカスケードと呼ぶ。暗状態における桿体細胞の膜電位は約-30 mV であり、ニューロンや他の活動電位を発生させる細胞の膜電位に比べて高いことが知られている。これは少し脱分極している状態なので、桿体細胞は暗状態でも常に神経伝達物質を放出している状態となる。光が当たったときの桿体細胞の反応は過分極となり神経伝達物質の放出が減少し、その変化が脳に伝わることで視覚が形成される。

活性型のロドプシンであるメタロドプシンⅡbは非常に不安定なため、*all-trans-retinal*は酵素反応を介さずにオプシンから分離する。これにより光シグナル伝達の刺激が終了する。また、活性型であるGTP-トランスデューシンは、GTPase accelerating protein (GAP)により不活性型であるGDP-トランスデューシンに戻される。このような仕組みにより、光刺激が途絶えると光シグナル伝達系も速やかに不活性化され、必要以上に刺激が継続されることを防いでいる。

また、桿体細胞は明るさが異なる光条件でもコントラストを得ることができる仕組みとして、わずかな明るさの条件でも感度よく光を受容し、光刺激が強くなるにつれて光シグナル伝達は阻害される。この働きにはロドプシンキナーゼとアレスチンが関わっている。オプシン分子はリン酸化されるセリン残基が3個あり、オプシンが光によって活性化された状態の時間に比例してオプシンのリン酸化の程度が決まる。さらに、リン酸化されるほどトランスデューシンを活性化することができなくなる。そのため、外界が明るく光刺激が強いほどオプシン分子はリン酸化されトランスデューシンの活性化が弱くなる。さらに、3個のセリン残基全てがリン酸化されたオプシンにはアレスチンが結合し、トランスデューシンの活性化を完全に抑制する。これにより、光刺激が強すぎる場合でも桿体細胞の興奮を適切に調節することができる^{11,12}。

1-4 視サイクルにおける RPE65 と視機能

視細胞外節に存在するオプシンは視細胞自らが合成することによって供給されるが、*11-cis-retinal*は視細胞に隣接して存在する網膜色素上皮細胞 (Retinal Pigment Epithelium: RPE) によって供給される¹³。また、網膜色素上皮細胞による*11-cis-retinal*の供給は正常な視覚の維持にとって必須である¹⁴⁻¹⁶。光の吸収により活性化された視物質では*11-cis-retinal*から*all-trans-retinal*への異性化が起こる。網膜色素上皮細胞は消費された*11-cis-retinal*を視細胞へ供給し、視物質を再生させる。この経路は一般に視サイクルと呼ばれ、*all-trans-retinol* (ビタミンA) とその類縁化合物であるレチノイドの循環経路である¹⁷ (図1)。

光の吸収により異性化された*all-trans-retinal*は視細胞外節で*all-trans-retinol* dehydrogenase (RDH8, RDH12)により*all-trans-retinol*に変換される¹⁸。視細胞で産生された*all-trans-retinol*はcellular retinoid-binding protein 1 (CRBP1)により網膜色素上皮細胞に輸送される¹⁹。網膜色素上皮細胞に取り込まれた*all-trans-retinol*はLecithin-retinol acyltransferase (Lrat)により*all-trans-retinyl ester*

に変換され、網膜色素上皮細胞内に貯蔵される²⁰。all-*trans*-retinyl ester を 11-*cis*-retinol へ変換する酵素として Retinal Pigment Epithelium 65 (RPE65) が重要な役割を担っていることが考えられていたが、解析が困難であることから長い間その機能が明らかにされていなかった。近年、複数のグループから RPE65 が単体で all-*trans*-retinyl ester を 11-*cis*-retinol へ変換する機能をもつことが証明された²¹⁻²⁴。RPE65 は異性化反応と、エステル化合物から脂肪酸を取り除く脱水反応をおこなう isomerohydrolase であることが同定された。RPE65 により生成された 11-*cis*-retinol は網膜色素上皮細胞内に存在する 11-*cis*-retinol dehydrogenase である RDH5 および RDH11 により 11-*cis*-retinal に再生される²⁵。この 11-*cis*-retinal は cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) により視細胞へ輸送され、再びオプシンと結合することで視物質として再利用される。

RPE65 は網膜色素変性やレーバー先天盲の原因遺伝子であり、RPE65 遺伝子異常によるこれらの疾患は乳児期から高度に視機能が障害される²⁶⁻³⁴。また、視サイクルにおいて、RPE65 は all-*trans*-retinyl ester を 11-*cis*-retinol する唯一の酵素である。そのため、RPE65 遺伝子を欠損した *Rpe65*^{-/-} マウスでは 11-*cis*-retinol および 11-*cis*-retinal の産生が完全に阻害され、視覚応答は全く反応を示さない³⁵⁻³⁸。これらの報告は、RPE65 は 11-*cis*-retinal の合成に必須であり、ヒトおよびマウスの正常な視覚形成において重要な役割を果たしていることを示している。

1-5 視サイクル異常と網膜変性

ヒト RPE65 遺伝子異常では視機能障害だけではなく、若年時より網膜変性が進行し錐体細胞外節および内節長の減少と錐体細胞核層の非薄化を生じることが報告されている^{39, 40}。ヒト RPE65 遺伝子変異では錐体細胞変性が顕著に認められるが、網膜変性の機構については明らかにされていない。そのため、モデル動物である *Rpe65*^{-/-} マウスにおいても錐体細胞に着目した研究がおこなわれてきた。まず、*Rpe65*^{-/-} マウスは桿体細胞が比較的緩慢に変性するが、錐体細胞は急速に変性することが報告されている^{35, 41, 42}。さらに、桿体細胞特異的に発現するオプシンであるロドプシンの局在は正常と同じく外節に限局的であるが、錐体細胞特異的に発現する錐体オプシンは外節のほかに外顆粒層や外網状層にも発現が見られ、異常な局在パターンを示すことも知られている^{43, 44}。*Rpe65*^{-/-} マウスと同じく 11-*cis*-retinal を合成せず、レーバー先天盲のモデル動物である Lecithin-retinol acyltransferase 欠損 (*Lrat*^{-/-}) マウスも、*Rpe65*^{-/-} マウスと同様に

錐体オプシンが外節に正常に輸送されないことが報告されている^{20, 45}。*Rpe65*^{-/-}マウスと *Lrat*^{-/-}マウスで見られる錐体オプシンの輸送異常は、11-*cis*-retinal の投与によって改善されることも報告されている^{43, 44, 46}。加えて、錐体細胞のマーカーである Peanut agglutinin (PNA) レクチン陽性細胞が *Rpe65*^{-/-}マウスで減少しており、錐体細胞が変性していると考えられている^{41, 46}。これらの研究は、錐体オプシンの正常な輸送や錐体細胞の生存維持には 11-*cis*-retinal が必要であるということを示唆しているが、11-*cis*-retinal 枯渇時における錐体オプシンの輸送異常や錐体細胞変性の分子メカニズムについては明らかになっていない。

1-6 レチノイドとオプシン

ビタミン A とその類縁化合物であるレチノイドがオプシンに与える影響についての研究は、ショウジョウバエを用いた実験報告が多くある。レチノイド代謝異常である *ninaD* 遺伝子変異のショウジョウバエでは、野生型に比べ高分子量である Rh1 オプシン（高等動物のロドプシンに相当）タンパク質が存在し、小胞体に局在してしまうことが報告されている⁴⁷。また、ビタミン A 前駆体であるカロテノイド非存在下でショウジョウバエを飼育すると、タンパク質成熟過程における中間体と思われる、糖鎖切断が不完全な Rh1 オプシンが存在することが報告されている^{48, 49}。さらに Huber らは、発色団はショウジョウバエのオプシン遺伝子の転写制御に関与していないが、翻訳されたオプシタンパク質を安定化させる役割を担っていると報告している^{47, 49}。加えて、オプシンと発色団が小胞体内で結合していることを示唆する研究結果も報告されている⁵⁰。これらの研究結果は、ショウジョウバエにおけるオプシタンパク質の成熟や小胞体からの輸送および安定性にはレチノイド代謝により視細胞へ供給される発色団が関与しており、発色団はオプシタンパク質の翻訳後修飾に重要な役割を果たしていることを示している。しかしながら、ヒトやマウスにおいても発色団 (11-*cis*-retinal) がオプシンの翻訳後修飾を制御しているのかどうかについては、これまでには詳細な報告がない。

そのため、本研究では高等動物であるマウスのオプシンに対して 11-*cis*-retinal がもたらす影響を、転写レベルおよび翻訳後修飾レベルで解析することを目的とした。これにより、視覚形成に必須であるオプシンが網膜内で正常に発現存在するために、11-*cis*-retinal がオプシンに対してどのような役割を担っているか

という分子機構を、高等動物のレベルで明らかにすることができる。また、これらのメカニズムを調べることは、RPE65 遺伝子異常により引き起こされる治療のない網膜変性疾患に対して、その分子病態の一端を理解する上でも意義深いものであると考える。そこで著者は、マウスのオプシンに対する 11-*cis*-retinal の影響を調べるため、視サイクル異常により 11-*cis*-retinal を欠損した *Rpe65*^{-/-}マウスを用いた。このモデル動物を用い、マウスが発現する三種類のオプシン (S-opsin、M-opsin、ロドプシン) の転写および翻訳後修飾における 11-*cis*-retinal の役割について検討した。さらに、観察されたオプシンの異常と網膜変性との関連について検討した。

2. 実験材料および実験方法

2-1 実験動物

以下の動物実験は弘前大学動物実験の指針に則っておこなった。野生型として用いたC57BL/6Jマウスは日本クレア社から購入した。*Rpe65*^{-/-}マウスは Matthew. M. Lavail博士 (University of California in San Francisco) より供与された。この*Rpe65*^{-/-}マウスはT. Michael Redmond博士 (National Institute of Health) により、以下の方法で作製された。マウス*Rpe65*遺伝子は129SVマウスゲノムライブラリーから分離した。ここから、エクソン1, 2および3を含む7.7-kbの*EcoR* I 断片領域と、2.8-kbの5' flanking領域をBluescript II SK (-) にサブクローンした。5' flanking領域から1.7-kbの*EcoR* I /*Afl* II 断片をpLPG9にサブクローンし、*EcoR* I /*BamH* I 断片としてリニアライズした。Intoron C領域から2.2-kbの*Ecl*136 II /*EcoR* I 断片をpLPG9にサブクローンし、*Xho* I /*Not* I 断片としてリニアライズした。これらのリニアライズした断片をX-pPNTに挿入したものをpPNT-*Rpe65*とした。pPNT-*Rpe65*を*Not* I でリニアライズし、エレクトロポレーションで129SVマウス由来のES細胞内に導入した。G418/gancyclovirを用いて、*Rpe65*遺伝子のエクソン1からエクソン3までがPGK-neoに置き換わる相同組み替えが起こったES細胞をクローニングした。目的どおりに相同組み替えが起こったかどうかを確認するために、ゲノムDNAを*Hind*IIIで切断したのちにサザンブロッティングをおこなった。このクローニングしたES細胞をC57BL/6Jの胚盤胞にマイクロインジェクションし、キメラマウスを得た。その後、C57BL/6Jとかけ合わせることでヘテロおよびホモの*Rpe65*ノックアウトマウスを得た。*RPE65*のエクソン4からエクソン6を増幅するプライマーでRT-PCRをおこない、得られた*Rpe65*^{-/-}マウスは*RPE65*の転写発現をしていないことを確認した³⁵。

これらの動物は弘前大学医学部動物実験施設内のアイソラック中で22±3°C、湿度60%の下、12時間消灯（10 lux以下）、12時間点灯（50 lux前後）の条件下で飼育した。

2-2 Total RNA 抽出

野生型マウスおよび*Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を摘出したのち、実体顕微鏡下、氷上で網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜を採取した。2眼分を1.5 ml エッペンドルフチューブに入れた直後にドライアイスで凍結させ、実験に用いるまで-80°Cで保

存した。RNA 抽出には ISOGEN (Nippon Gene, Osaka, 311-02501) を用い、付属のマニュアルに従っておこなった。具体的には、網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜 2 眼分に対し 500 μ l の ISOGEN を加えボルテックスおよびピペティングにより組織を十分に溶解させたのち、室温で 5 分間静置した。その後 100 μ l のクロロホルムを加え 15 秒ボルテックスしたのち、室温で 5 分間静置した。これを 12000 \times g、15 分間、4°C で遠心したのち、水層 (上清) を新しい 1.5 mL エッペンドルフチューブに移した。これに 200 μ l の 2-プロパノールを加えボルテックスしたのち、室温で 10 分間静置した。その後 12000 \times g、10 分間、4°C で遠心したのち上清を捨て、沈殿に 500 μ l の 70% エタノールを加えてボルテックスした。これを 7500 \times g、5 分間、4°C で遠心したのち上清を捨て、蓋を空けてエタノールを乾燥させた。乾燥後の RNA を 15 μ l の diethylpyrocarbonate (DEPC) 水 (Nacalai, Kyoto) に溶かした。得られた RNA の量および精製度は nano drop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, ND-1000) を用いて吸光度を測定し算出した。精製度の低いもの (260 nm/280 nm が 1.6 以下) はサンプルとして除外した。

2-3 cDNA 合成

網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜より抽出した RNA を鋳型とし、cDNA を合成した。cDNA 合成には 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche, Indianapolis, IN, 11483188001) を用いた。1 μ g の鋳型 RNA に対し、10 \times Reaction Buffer を 2 μ l、25 mM MgCl₂ を 4 μ l、Random Primer p(dN)₆ を 2 μ l、RNase Inhibitor を 1 μ l、AMV Reverse Transcriptase を 0.8 μ l 加えた。この混合液をサーマルサイクラーにて 25°C で 10 分間、42°C で 60 分間反応させたのち、反応後は 4°C で 5 分間冷却した。合成後の cDNA に 180 μ l の DEPC 水を加えて希釈し、-30°C で保存した。

2-4 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR は Takara Taq (Takara, Osaka, R001A, 5 units/ μ l) を使用しておこなった。用いた RPE65 のプライマー配列は表 1 に示した³⁵。PCR 反応は 0.5 μ l の cDNA に対し、終濃度 0.5 μ M の Forward および Reverse プライマーを使用した。PCR 反応条件は、1 サイクル-94°C 4 分、35 サイクル-94°C 30 秒、54°C 30 秒、72°C 30 秒でおこなった。PCR 後の反応産物は 1.5% アガロースゲルとトリスホウ酸 EDTA (TBE) 緩衝液により電気泳動をおこない、臭化エチジウムで染色したのちプリントグラフ (ATTO, Tokyo) で撮影した。

2-5 ウェスタンブロッティング

錐体オプシンおよびロドプシンを検出するため、野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を摘出したのち、網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜を採取した。採取した組織に溶解緩衝液（5 mM トリス塩酸緩衝液（Tris-HCl）, pH 7.5、65 mM 塩化ナトリウム（NaCl）、2 mM 塩化マグネシウム（MgCl₂）、1 % TritonX-100、プロテアーゼ阻害剤混合物（Roche））を加え、ガラス-テフロンホモジナイザーを用い氷中で破碎した。15000 × g、5 分間、4°Cの遠心分離後に上清を回収し、サンプルとして用いた。また、RPE65 を検出するため、野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を摘出し、リン酸緩衝食塩水（PBS）に浸してホモジナイズしたのち超音波破碎を 15 秒間、3 回おこなった。15000 × g、5 分間、4°Cの遠心分離後に上清を回収し、サンプルとして用いた⁵¹。Bio-Rad Protein Assay（BIO-RAD, Hercules, CA, 500-0006）を用いた Bradford 法にてタンパク質定量をおこないサンプル濃度を決定したのち、使用するまで-30°Cで保存した⁵²。ウェスタンブロッティングは Townbin らの方法に従った⁵³。S-opsin の検出には 15%、M-opsin, rhodopsin の検出には 12%、RPE65 の検出には 10%ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE をおこないタンパク質を分離した。分子量マーカーには Precision Plus Protein Dual Color Standard（BIO-RAD, 161-0374）および Magic Mark（Invitrogen, Carlsbad, CA, LC5602）を用いた。60V で 20 分の電気泳動後に 100V、2 時間の電気泳動でタンパク質を分離したのち、タンク式転写装置にて Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜（BIO-RAD, 162-0177）に 18V、16-18 時間転写した。

転写後の膜を0.05 % Tween-20 を含むPBS（Tw-PBS）で洗浄し、非特異的な反応を防ぐためにブロッキングをおこなった。ブロッキング溶液は、S-opsinの検出には1 % ブタ血清を含むTw-PBSを、M-opsinの検出には1 % ヤギ血清を含む Tw-PBSを、rhodopsinの検出には1 % ウサギ血清を含むTw-PBSを、RPE65の検出には0.5 % スキムミルクを含むTw-PBSをそれぞれ使用し、室温で1時間震盪した。その後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体に浸し、ハイブリパック（Cosmo Bio, Tokyo, S-1021）で密閉したのち4°Cで一晩震盪した。一次抗体には、ヤギ抗 S-opsin抗体（1:5000、Santa Cruz, Delaware, CA, sc-14363）、ウサギ抗M-opsin抗体（1:5000、Chemicon, Temecula, CA, AB5405）、マウスモノクローナル抗rhodopsin抗体（1:10000、Chemicon, MAB5316）、マウスモノクローナル抗RPE65抗体（1:5000、Chemicon, MAB5428）を使用した。反応後のPVDF膜をTw-PBSで20分間、3回洗浄したのち、二次抗体を希釈した溶液に浸し室温で1時間震盪した。二次抗体に

は、HRP標識ウサギ抗ヤギ抗体（1:5000、DAKO, Cambridge, UK, P0160）、HRP標識ヤギ抗ウサギ抗体（1:5000、DAKO, P0448）、HRP標識ウサギ抗マウス抗体（1:5000、DAKO, P0260）を用いた。反応後のPVDF膜をTw-PBSで20分間、3回洗ったのち、ECL およびECL plus Western blotting detection reagents (GE Healthcare, Piscataway, NJ, RPN2209, RPN2132) を用いて化学発光をおこなった。バンドはLAS3000 mini (FUJIFILM, Tokyo) のCCDカメラによって取り込まれ、デジタルデータとして映像化された。Loading controlとしてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を検出するため、re-blot western blot recycling kit (Chemicon, 2060) により使用したPVDF膜から抗体をストリッピングしたのち、ウサギ抗GAPDH抗体（1:10000、Abcam, Cambridge, MA, ab36840）を使用した。

2-6 凍結切片作製

野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を摘出し、直後に OCT compound (Sakura, Tokyo, Tissue-Tek, 4583) 中で凍結包埋した。包埋時には眼球の上下がわかるようにインクで印をつけた。クリオスタット (Thermo Scientific, HM 500 O) で包埋した眼球を 5 μ m の厚さに薄切し、MAS コートのスライドガラス (松波硝子工業) にのせた。作製した切片は免疫染色をおこなうまで-30°Cで保存した。

2-7 免疫組織化学

組織を固定するため、凍結切片を固定液に室温で 15 分間浸した。固定液として、各種オプシンを検出する場合は 4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1M PB (pH 7.4)を、RPE65 を検出する場合はアセトンを用いた。固定後の切片を PBS で 20 分間洗浄したのち、0.3%過酸化水素を含むメタノールに 15 分間浸し、内在性ペルオキシダーゼを不活性化する処理をした。その後、Tw-PBS による 5 分間の洗浄を 3 回おこなった。洗浄後、非特異的反応を防ぐためにブロッキングを以下の条件でおこなった。S-opsin と rhodopsin を検出するために 5%スキムミルクを含む Tw-PBS に切片を浸し室温で 1 時間、M-opsin を検出するために 5%スキムミルクを含む Tw-PBS に切片を浸し室温で 2 時間、RPE65 を検出するために 0.5%スキムミルクを含む Tw-PBS に切片を浸し室温で 1 時間反応させた。一次抗体は表 2 に示した濃度に希釈し、凍結切片と 4°Cで一晩反応させた。Tw-PBS による 5 分間の洗浄を 3 回おこなったのち、表 2 に示した濃度に希釈した二次

抗体と 4°Cで一晩反応させた。rhodopsin の検出には 1:800 希釈、その他の場合は 1:200 希釈で二次抗体を使用した。Tw-PBS で 5 分間の洗浄を 3 回おこなったのち、各種オプシンの検出には 0.05% diaminobenzidine (DAB, Nichirei, Tokyo, 415171)を用いて目的タンパク質を発色させた。RPE65 および M-opsin の検出には tetramethylrhodamine 標識チラミド (PerkinElmer, Waltham, MA, NEL702) を用い、室温で 10 分間反応させた。核染色には 1%メチルグリーンおよび DAPI 含有封入剤 (Vector, Burlingame, CA, H-1200) を用いた。明視野観察には正立顕微鏡 (BX60, Olympus) と CCD カメラ (DP71, Olympus)、蛍光観察には共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, Tokyo, FV 1000-D) を使用した。

2-8 網膜フラットマウント

野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M PB (pH 7.4) で室温にて1時間固定した。PBSで洗浄したのち、角膜と水晶体を取り外した。網膜色素上皮細胞層から網膜を剥離させ、網膜を4%パラホルムアルデヒドを含む0.1 M PBに浸し、4°Cにて一晩固定した。PBSで洗浄したのち、5%スキムミルクを含むTw-PBSを用いて室温で1時間ブロッキングした。その後、網膜をやぎ抗S-opsin抗体溶液 (1:400) に浸し4°Cにて一晩反応させた。PBSで洗浄したのち、ビオチン標識ウサギ抗ヤギ抗体 (1:200, Vector, BA-5000) 溶液に浸し、4°Cにて一晩反応させた。PBSで洗浄したのち、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ストレプトアビジン (1:200, DAKO, F0422) 溶液に浸し、室温で1時間反応させた。PBSで洗浄したのち、視細胞側が上になるようにスライドガラス上にのせ、水溶性封入剤Permafluor (Beckman Coulter, Fullerton, CA, PN-IM0752) にて封入した。網膜標本は共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FV 1000-D) を用い400倍の倍率で撮影した。網膜の上方および下方について各4カ所を無作為に選び撮影した。FITC陽性細胞数はソフトウェアImage-Pro Plus (Nippon Roper, Tokyo) を用いて計測した。

2-9 リアルタイム PCR を用いた半定量性 RT-PCR 法

リアルタイム PCR には SYBR Premix Ex Taq (Takara, RR041A) を用いた。S-opsin、M-opsin、Rhodopsin、 β -actin のプライマー配列は表 1 に示した^{35, 41, 54}。Forward および Reverse プライマーは終濃度で各 0.2 μ M を使用した。リアルタイム PCR には LightCycler version 3.5 (Roche) を用いた。PCR 反応条件は、1 サイ

クル-95°C 10 秒、40 サイクル-95°C 5 秒、60°C 20 秒でおこなった。PCR 反応の特異性は融解曲線および 1.5%アガロースゲル電気泳動により確認した⁵⁵。電気泳動に使用したサンプルは図 5A に示したサイクル数でリアルタイム PCR したものを使用した。S-opsin、M-opsin および Rhodopsin の mRNA 発現量は β -actin の発現量により補正し、半定量的に測定した。

2-10 N-型糖鎖切断

野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウスの網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜を溶解緩衝液中でホモジナイザーにより破碎し、以下の組成の反応液内で25°C、1時間反応させN-型糖鎖を切断した。peptide-N-glycosidase (PNGase) F (サンプル27.5 mg あたり1.0 mU, Takara, 4450) を含む100 mM Tris-HCl (pH 8.6)、0.15% 2-メルカプトエタノール、1% ノニデット P-40、0.1% SDS。反応後のサンプルは15%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEをおこないタンパク質を分離した。一次抗体にはヤギ抗S-opsin抗体を用い、ECL plus Western blotting detection reagentsにて化学発光をおこないバンドを検出した。

2-11 プロテアーゼ阻害剤およびレチノイド調整

Pepstain A (Peptide institute, Osaka, 4397-v)、E64d (Peptide institute, 4321-v) およびMG-132 (sigma, St. Louis, MO, C2211)はDMSOに溶解し、使用するまで-30°Cで保存した。9-*cis*-retinal (sigma, R5754) は暗条件の赤色灯下において、99.5%エタノールに溶解したのちアルゴンガス封入し-80°Cで保存した。溶解後の9-*cis*-retinal の濃度を測定するために200-500 nmの範囲においてスペクトルを測定した。 λ_{\max} =373、モル吸光係数=36100 から9-*cis*-retinal の濃度を求めた。

2-12 網膜培養

3週齢の野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を使用した。クリーンベンチ内の実体顕微鏡下、氷上で角膜を除去したのち、滅菌済みのハanks平衡塩類緩衝溶液 (HBSS, Nissui, Tokyo) で洗浄した。プロテアーゼ阻害剤および9-*cis*-retinal を加えた網膜培養用培地 (50% Dulbecco's Modified Eagle MEM (DMEM, Nissui, 25%ウシ胎児血清、25%HBSS、2 mM L-グルタミン、ストレプトマイシン/ペニシリン含有) を6ウェルプレートに1 mL 加え、インターセル (Chemicon) を入れて膜を培地に数分なじませたのち、インターセル内に網膜

培養用培地を 2 mL 加えた。角膜除去した眼球をインターセル内に 4 眼ずつ入れ、CO₂ インキュベーター（5% 二酸化炭素、95% 空気、37°C）で培養した。

2-13 ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色

4% パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M PB (pH 7.4) に凍結切片を浸し室温で 15 分間固定した。PBS で 5 分間の洗浄を 3 回おこなったのち、カラッチ・ヘマトキシリン溶液（武藤化学、東京）で 10 秒間染色し、流水で 5 分間洗浄した。その後エオジン Y 1% 溶液（武藤化学）で 1 秒間染色したのち、70% エタノールで 5 分間、99.5% エタノールで 5 分間脱水しキシレンで透徹し、非水溶性封入剤 MGK-S（松波硝子工業、大阪）で封入した。

2-14 TdT-dUTP terminal nick-end labeling (TUNEL)

アポトーシス検出キット (*in situ* Apoptosis Detection kit, Takara, Tokyo) を使用した。手順はキットの説明書に従い、核染色として DAPI 含有封入剤 (Vector, H1200) を用いた。

2-15 電子顕微鏡

野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-} マウスの眼球を摘出し、2.5% グルタルアルデヒド (TAAB, Berkshire, UK) に入れ 4°C で 3-7 日固定した。その後、0.05 M カコジル酸緩衝液 (pH7.4) で洗浄し、1% 四酸化オスミウム (TAAB) に浸し 4°C で 2 時間固定した。その後、0.05 M カコジル酸緩衝液 (pH7.4) で洗浄し、50%、60%、70%、80%、90% エタノールに 10 分間ずつ、99.5% エタノールと無水エタノールで 20 分間×3 回ずつ脱水した。その後、酸化プロピレンに置換したのち、室温で酸化プロピレン：エポン樹脂 (Aradide CY212 resin : DDSA EM : Dibutyl phthalate : DMP-30 = 10 : 10 : 1 : 0.4) = 3 : 1 で 2 時間、酸化プロピレン：エポン樹脂 = 1 : 1 で 2 時間、酸化プロピレン：エポン樹脂 = 1 : 3 で 2 時間、エポン樹脂のみで一晩置換し、眼球にエポン樹脂を浸透させた。その後、ゼラチンカプセル (TAAB) にエポン樹脂と眼球を入れ、37°C で 24 時間、60°C で 3 日以上インキュベートして樹脂を重合させたのち室温に戻し、ガラスナイフで眼球を削り、0.75 μm の厚さに薄切し、トルイジンブルー染色をした。染色した網膜組織を光学顕微鏡で観察し、電子顕微鏡で観察したい場所を特定したのちにダイヤモンドナイフで 75-85 nm の超薄切片を作製し観察用メッシュ (ベコグリッド、

オランダベコ社) の上に貼付けた。メッシュごと 3%ウラン染色を 7 分間、蒸留水で洗浄ののち鉛染色 (Reynolds 法) を 7 分間おこない、蒸留水で洗浄し乾燥させたのちに電子顕微鏡で観察した。観察には透過型電子顕微鏡 (JEM-1230、日本電子株式会社、東京) を使用した。

2-16 統計解析

統計学的解析には unpaired t-test (Student's t-test) を用いた。結果は Mean ± Standard deviation (SD) で表した。有意水準を $P < 0.05$ とした。

3. 実験結果

3-1 RPE65 発現の確認

使用した *Rpe65*^{-/-}マウスで RPE65 が発現していないことを確認するため、網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜サンプルを用いて RPE65 の mRNA およびタンパク質の検出をおこなった。RT-PCR の結果、野生型マウスでは PCR 産物が確認されたが *Rpe65*^{-/-}マウスでは PCR 産物は認められなかった (図 2A)。ウェスタンブロッティングの結果、野生型マウスでは RPE65 のタンパク質が検出されたが、*Rpe65*^{-/-}マウスでは RPE65 のタンパク質は検出されなかった (図 2B)。免疫染色の結果、野生型マウスでは RPE 層に特異的に RPE65 の局在を認めたが、*Rpe65*^{-/-}マウスでは抗 RPE65 抗体による免疫反応が認められなかった (図 2C)。

3-2 *Rpe65*^{-/-}マウスにおける錐体オプシンとロドプシンの局在

野生型マウスと *Rpe65*^{-/-}マウスにおけるオプシンタンパク質の局在について比較するため、免疫染色をおこなった。野生型マウスの S-opsin は錐体細胞外節に局在を認めたが、*Rpe65*^{-/-}マウスでは錐体細胞外節のほかに外顆粒層や外網状層にも局在を認めた (図 3A)。野生型マウスの M-opsin も S-opsin と同様に錐体細胞外節に局在を認めたが、*Rpe65*^{-/-}マウスでは抗 M-opsin 抗体による免疫反応はほとんど見られなかった (図 3B)。rhodopsin の局在は野生型と *Rpe65*^{-/-}マウスともに桿体細胞外節のみに見られ、局在箇所の違いは認められなかった (図 3C)。

3-3 *Rpe65*^{-/-}マウスの網膜内における S-opsin の分布

Rpe65^{-/-}マウスにおける S 型-錐体細胞の変性時期を調べるために、網膜フラットマウントを作製し S 型-錐体細胞のマーカータンパク質である S-opsin の陽性細胞数を測定した。マウス網膜内の S-opsin 発現分布には勾配があり、網膜下方で S-opsin 発現細胞が多い一方、網膜上方では S-opsin 発現細胞は少ないとの報告がある^{2,56}。そのため、S-opsin 陽性細胞数の測定は網膜下方および網膜上方を区別して標本を撮影し、視細胞外節に存在する S-opsin 陽性細胞数の測定をおこなった (n=3, Mean±SD)。図 4A に網膜下方の S-opsin 染色画像を、図 4C に網膜上方の S-opsin 染色画像を示した。網膜下方における 3, 5, 7 週齢の野生型マウスの S-opsin 陽性細胞数は約 1100-1300 個/視野であった。網膜下方における 3 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの S-opsin 陽性細胞数は野生型と比較して有意な差を認めなかつ

たが、5週齢および7週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスS-opsin陽性細胞数は野生型と比較して有意に減少しており、野生型に比べおよそ20%の細胞数であった（図 4B）。網膜上方における3, 5, 7週齢の野生型マウスのS-opsin陽性細胞数は約200-400個/視野であった。一方、網膜上方における3, 5, 7週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスのS-opsin陽性細胞数は野生型と比較して有意な増加を認め、野生型に比べおよそ2.5-3倍に増加していた（図 4D）。

3-4 *Rpe65*^{-/-}マウスにおける錐体オプシンおよびロドプシンの遺伝子発現

11-*cis*-retinal 欠損によるオプシンの転写レベルへの影響を調べるために、リアルタイム RT-PCR を用いて野生型マウスおよび*Rpe65*^{-/-}マウス網膜内の錐体オプシンおよびロドプシンの mRNA 発現量を測定した（n=6, Mean±SD）。使用した cDNA 量を補正するために β -actin の発現量で標準化した。図 5A にリアルタイム RT-PCR 後の PCR 産物を電気泳動した典型的なデータを示した。3 および 5 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの S-opsin mRNA 発現量は同週齢の野生型マウスと同程度の発現量を示したが（有意差なし）、7 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの S-opsin mRNA 発現量は同週齢の野生型マウスと比較して有意に減少していた（図 5B）。M-opsin も同様に、3 および 5 週齢では野生型と *Rpe65*^{-/-}マウスでは mRNA 発現量に差は認められなかったが、7 週齢では *Rpe65*^{-/-}マウスの M-opsin 発現量は野生型マウスと比較して有意に減少していた（図 5C）。しかしながら、ロドプシンの mRNA 発現量は 3, 5, 7 週齢すべての週齢において *Rpe65*^{-/-}マウスで有意な減少が認められた（図 5D）。*Rpe65*^{-/-}マウスにおいて野生型に比べて有意に mRNA 発現量が減少している週齢では、目視でも明らかに PCR 産物のバンド輝度が低下していた（図 5A）。

3-5 *Rpe65*^{-/-}マウスにおける錐体オプシンおよびロドプシンのタンパク質発現

三種類のオプシンのタンパク質レベルが転写レベルと相関を示すかどうかを調べるために、野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウス網膜内の錐体オプシンおよびロドプシンのタンパク質発現をウェスタンブロッティングにより調べた。3, 5, 7 週齢の野生型マウスの S-opsin は約 40 kDa に主要なバンドを、約 42 kDa に薄いバンドを認めた。3 および 5 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスでは約 42 kDa にのみ S-opsin

のバンドを認め、7週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスでは S-opsin のバンドは確認されなかった (図 6A)。

一方、M-opsin タンパク質検出の結果、3, 5, 7 週齢の野生型マウスでは約 41 kDa にバンドを認めたが、*Rpe65*^{-/-}マウスではバンドがほとんど検出されなかった (図 6B)。S-opsin および M-opsin の検出後に PVDF 膜をストリッピングし、Loading control として GAPDH を検出した。各サンプルにおける GAPDH の発現量は同程度であった。

抗ロドプシン抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果、野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウスのどちらも約 38 kDa に主要なバンドを認めた。しかし、発現量は野生型に比べ *Rpe65*^{-/-}マウスでは低く、3 週齢から 7 週齢になるにつれて *Rpe65*^{-/-}マウスのロドプシン発現量は減少していた (図 6C)。また、野生型マウスでは約 80 kDa の位置にダイマーと思われるバンドを認めた。ロドプシンの検出後に PVDF 膜をストリッピングし GAPDH の検出を試みたが、鮮明なバンドを得ることができなかった (データ不掲載)。そのため、ロドプシンの検出とは別に新たな PVDF 膜にタンパク質を転写し GAPDH を検出した。各サンプルにおける GAPDH の発現量は同程度であった。

3-6 *Rpe65*^{-/-}マウスにおける錐体オプシンの翻訳後修飾解析

Rpe65^{-/-}マウスの S-opsin タンパク質は移動度が野生型マウスと異なっており、野生型マウスに比べて分子量が大きいことが示された (図 6A)。分子量の違いは糖鎖部分に起因するのか、それともタンパク質部分に起因するのかを調べるために、PNGase F による糖鎖切断実験をおこなった。PNGase F は高マンノース型、複合型および混成型の N 型糖鎖を認識し、アスパラギン酸と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の間を切断する。S-opsin は N 型糖鎖を一つもつ糖タンパク質であり、PNGase F 処理をおこなうことで *Rpe65*^{-/-}マウスの S-opsin の受けている翻訳後修飾が不完全な糖鎖切断かどうかを判断することができる。3 週齢のマウス網膜サンプルを PNGase F 処理したのちウェスタンブロッティングで S-opsin を検出した結果、野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウスはどちらも約 35 kDa に検出された (図 7A)。この結果は、糖タンパク質である S-opsin のタンパク質部分は、野生型マウスと *Rpe65*^{-/-}マウスで同じ分子量であることを示している。このことから、*Rpe65*^{-/-}マウスの S-opsin の分子量が大きい原因は、野生型に比べて N 型糖鎖の分子量が大きいからであると判明した。*Rpe65*^{-/-}マウスの S-opsin

は糖タンパク質成熟における翻訳後修飾の糖鎖切断の過程において、糖鎖切断が不完全なために分子量が大きくなっていることが示された。

さらに、ECL plus を用いた高感度な条件で S-opsin タンパク質を検出すると、*Rpe65*^{-/-}マウスのサンプルでのみ約 23 kDa と約 25 kDa にバンドを認めた(図 7B)。この二本のバンドは S-opsin を検出しているのか、それとも非特異的な反応であるかを調べるために、抗体作製時に抗原として用いたペプチド（ブロッキングペプチド）で一次抗体を吸収させる実験をおこなった。一次抗体吸収後のウェスタンブロットティングの結果、約 25 kDa のバンドは消失したが約 23 kDa のバンドは残ったままであった(図 7C)。これより、*Rpe65*^{-/-}マウスで検出された約 25kDa のバンドは S-opsin であるが、本来の分子量よりも小さいことから S-opsin タンパク質の分解産物であること、また約 23kDa のバンドは二次抗体による非特異的な反応産物であることが示された。

また、M-opsin においても野生型マウスと *Rpe65*^{-/-}マウスで移動度に違いがあるのかどうかを調べるために、ECL plus を用いた高感度な条件で *Rpe65*^{-/-}マウスの M-opsin を検出した。野生型と *Rpe65*^{-/-}マウスの移動度を比較するために、バンド輝度が同程度になるようにアプライするタンパク質量を調整した。ウェスタンブロットティングの結果、*Rpe65*^{-/-}マウスの M-opsin の移動度は野生型と同じであり、分子量の違いは見られなかった(図 7D)。

3-7 網膜培養

網膜に薬剤処理をする際、眼球内に投与すると硝子体液が還流されてしまい薬剤濃度が一定に保てない懸念がある。そのため、培養系の実験が適していると考え、網膜を培養するための実験条件を検討した。当初は網膜組織のみで培養を試みたが、培養後に網膜組織が崩れて培地中に拡散してしまい、サンプルが回収できず、また組織切片も作製することができなかった(データ未掲載)。そのため、網膜を眼球ごと培養した。網膜に対する培地の浸透を良くする目的で角膜除去をおこない、眼球や網膜の形態をできるだけ維持する目的で水晶体は眼球内に残した。

まず、網膜組織に対する培養の影響を調べるため、野生型マウスの眼球を 12 時間および 24 時間培養し、凍結切片を作製して網膜組織を観察した。比較のため培養していない眼球の網膜切片も作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色の結果、培養していない眼球の網膜組織は層構造に乱れがなく、外顆粒層

および内顆粒層の細胞が密に存在していた（図 8A, B）。一方、培養した眼球の網膜組織は層構造が歪んでいるものの、外顆粒層および内顆粒層内に目立った空胞化はなく細胞は比較的密に残存していた（図 8C-F）。続いて、培養における網膜細胞への傷害について調べるため、TUNEL 法によりアポトーシス細胞を検出した。ポジティブコントロールとして用いた網膜変性モデル動物である RCS ラット（4 週齢）では、視細胞が存在する外顆粒層に TUNEL 陽性細胞を多く認めた（図 9B）。培養していない野生型マウス（成体）では TUNEL 陽性細胞は検出されなかった（図 9A）。培養 12 時間後および 24 時間後の野生型マウスの網膜でも、TUNEL 陽性細胞はほとんど観察されなかった（図 9C, D）。

3-8 培養 *Rpe65*^{-/-}マウス網膜の M-opsin に対するプロテアーゼ阻害剤およびレチノイドの影響

まず、*Rpe65*^{-/-}マウスの M-opsin タンパク質が翻訳後に分解されているかどうかを調べるため、二種類の主要なタンパク質分解経路であるリソソームとプロテアソームによるタンパク質分解を阻害した。リソソーム阻害剤には pepstatin A および E64d を用い、プロテアソーム阻害剤には MG-132 を用いた。網膜培養用培地に 20 μ M pepstatin A、30 μ M E64d、10 μ M MG-132 を加え、3 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を 24 時間培養した。培養後の眼球から網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜を採取し、ウェスタンブロッティングにより M-opsin の発現量を調べた。三種類のタンパク質分解阻害剤を加えた群では、コントロールに比べ M-opsin の発現量が顕著に増加していた（図 10A）。GAPDH の発現量には変化は見られなかった。免疫染色の結果、三種類のプロテアーゼ阻害剤を加えた眼球ではコントロールに比べ M-opsin 陽性細胞数が多く、視細胞外節に加えて外顆粒層や外網状層にも M-opsin の局在を認めた（図 10B, C）。

続いて、三種類のプロテアーゼ阻害剤のうちどの阻害剤が M-opsin の分解を抑制しているのかを調べるため、それぞれの阻害剤を別々に投与し濃度の検討を行った。6 μ M および 30 μ M E64d を含む培地で 3 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を 24 時間培養し、培養後の網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜をサンプルとしてウェスタンブロッティングをおこなった。コントロールに比べて 6 μ M E64d 処理では M-opsin の発現量が若干増加していたが、30 μ M E64d 処理ではコントロールに比べ M-opsin の発現量は低下していた（図 11A）。免疫染色の結果、6 μ M および 30 μ M E64d 処理をした *Rpe65*^{-/-}マウス網膜の M-opsin 陽性細胞数はコント

ロールと同程度であった (図 11B-D)。一方、MG-132 を含む培地で 3 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を 24 時間培養した場合には、2 μ M および 10 μ M MG-132 処理により M-opsin 発現量が増加していることがウェスタンブロッティングで確認された (図 12A)。E64d 処理、MG-132 処理のいずれも未処理群と比べて GAPDH の発現量には変化は見られなかった。免疫染色の結果、2 μ M および 10 μ M MG-132 処理をした *Rpe65*^{-/-}マウスの網膜では M-opsin 陽性反応が視細胞外節で多く観察され、コントロールではほとんど観察されなかった外顆粒層や外網状層においても M-opsin の局在が観察された (図 12B-D)。これらの結果から、*Rpe65*^{-/-}マウスの M-opsin タンパク質は分解を受けており、プロテアソーム系で分解されていることが示された。

さらに、*Rpe65*^{-/-}マウスの M-opsin タンパク質が分解を受ける原因が 11-*cis*-retinal の欠損に因るものかどうかを調べるために、11-*cis*-retinal の代替としてアナログである 9-*cis*-retinal を用いた。0.05 nM、0.5 nM および 5 nM 9-*cis*-retinal を含む培地で 3 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を 24 時間培養すると、0.5 nM 9-*cis*-retinal 処理ではコントロールに比べ M-opsin の発現量が増加しており、5 nM 9-*cis*-retinal 処理でもわずかだが M-opsin の発現量増加を認めた (図 13A)。免疫染色により M-opsin の局在を観察した結果、コントロールでは視細胞外節に反応を認めたのに対し、0.5 nM および 5 nM 9-*cis*-retinal 処理では視細胞外節のほか外顆粒層や外網状層にも強い反応を認めた (図 13B-D)。次に、0.5 nM 9-*cis*-retinal を含む培地で 3 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を培養し、6 時間、12 時間、24 時間後に網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜を回収してウェスタンブロッティングをおこなった。培養 6 時間、12 時間および 24 時間後において、0.5 nM 9-*cis*-retinal 処理ではコントロールに比べ M-opsin の発現量が増加していた (図 14A)。また、5 μ M MG-132 を含む培地でも 3 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を培養し、同様に 6 時間、12 時間、24 時間後にサンプルを回収しウェスタンブロッティングをおこなった。いずれの時間も 5 μ M MG-132 処理により M-opsin の分解は若干抑えられていたが、0.5 nM 9-*cis*-retinal 処理ほどの差は見られなかった (図 14B)。GAPDH の発現量は 0.5 nM 9-*cis*-retinal 処理とコントロール間、5 μ M MG-132 処理とコントロール間で差はなかったが、培養時間が長くなるにつれて GAPDH 発現量の減少が認められた (図 14A, B)。

3-9 *Rpe65*^{-/-}マウスの微細形態観察

Rpe65^{-/-}マウスで観察された錐体オプシンの翻訳後修飾異常は形態異常や細胞死と関連があるのかどうかを調べるため、電子顕微鏡により視細胞の微細構造や核を観察し、視細胞の形態学的な異常の有無を検討した。まず視細胞外節を観察したところ、3週齢の野生型マウスでは棒状の外節が規則的に配列しており、外節内には円盤状の構造物が密に充填されていた(図 15A)。3週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスでは、一部の外節では円盤状の構造物の密度が低く、水泡状に膨らんでいる様子が観察された(図 15B)。5週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスでは、円盤状の構造物の密度が低く水泡状に膨らんでいる外節の割合が3週齢よりも多く観察され、ちぎれて崩壊している外節も観察された。野生型マウスで多く観察された正常な構造の外節は少数であった(図 15C)。7週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスでは、異常な構造の外節はまれに観察されるものの多くの外節は正常であった。しかしながら、外節の長さは短くなっており外節の数も少数であった(図 15D)。

次に内節の構造を観察したところ、3週齢の野生型マウスでは丸長の内節構造が密に配列しており、内節内にはミトコンドリアなどの細胞小器官も認められた(図 16A)。3および5週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスでは、特に異常な構造の内節は見られず野生型と同じような電子顕微鏡像が観察された(図 16B, C)。7週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスでも内節の構造異常は観察されず、ネクローシスで見られるようなミトコンドリアの膨潤も観察されなかった(図 16D)。

続いて視細胞核について観察したところ、3週齢の野生型マウスでも3, 5および7週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスにおいても、アポトーシスの特徴であるクロマチンの凝集やネクローシスの特徴である細胞膜の破裂は認められず、異常な構造を示す視細胞は観察されなかった(図 17)。

4. 考察

本実験において、*Rpe65*^{-/-}マウスのS-opsinは糖鎖切断が不完全な未成熟型の糖タンパク質であり、さらに局在異常や分解も起きていることが示された。一方、*Rpe65*^{-/-}マウスのM-opsinについてはmRNAが野生型と同程度発現しておりタンパク質への翻訳もおこなわれていた。さらにM-opsinタンパク質成熟も正常であったものの、11-*cis*-retinalと結合していないため非常に不安定であり翻訳後に分解されてしまうことが示された。電子顕微鏡の結果、*Rpe65*^{-/-}マウスの外節は崩壊していたが内節に顕著な異常は認められず、細胞死の所見もほとんど観察されなかった。これらの結果から、11-*cis*-retinalはマウスの網膜視細胞において、正常な錐体オプシタンパク質の発現や輸送および外節構造の維持に重要であるが、細胞生存に必須な要素ではないことが明らかとなった。

4-1 *Rpe65*^{-/-}マウスにおけるオプシタンパク質の成熟と局在

レチノイド代謝異常である*ninaD*変異体ショウジョウバエは、マウスのロドプシンに相当するRh1オプシンの分子量が野生型に比べて大きいことが報告されている⁴⁷。また、カロテノイド欠損状態で飼育したショウジョウバエは糖鎖切断が不完全なオプシンを発現することから、カロテノイドはオプシンの正常な糖鎖切断に必要であり、3-hydroxyretinalがショウジョウバエのオプシタンパク質の成熟に必須であることが報告されている⁴⁸。しかし本実験の結果から、*Rpe65*^{-/-}マウスにおけるロドプシンの分子量は野生型と比較して変化は見られなかった（図 6C）。これらの実験結果は、ロドプシタンパク質の糖鎖切断が正常におこなわれるためには、ショウジョウバエの場合では発色団となるレチノイドが必須であるが、マウスの場合では必須ではないということを示している。一方、S-opsinの分子量は野生型に比べ増加しており、糖鎖切断が不完全な未成熟タンパク質であることが明らかとなった（図 6A, 7A）。これらの結果は、RPE65を経由する視サイクルによって供給されるレチノイドはマウスのロドプシタンパク質の成熟には必要ではないが、S-opsinタンパク質の成熟には必要不可欠であることを示している。また、ウェスタンブロッティングにおける*Rpe65*^{-/-}マウスのM-opsinの移動度は野生型マウスのものと同じであった（図 7D）。そのため、*Rpe65*^{-/-}マウスに発現する三種類のオプシンであるロドプシン、S-opsin、M-opsinのうちS-opsinだけに不完全な糖鎖切断が起きていることが判明した。

ショウジョウバエの網膜における発色団は、ロドプシンが小胞体から分泌されるのに重要な役割を果たしている⁴⁷。しかしながら、本実験では*Rpe65*^{-/-}マウスのロドプシンは正常に外節に輸送されていた(図 3C)。これらの違いは、ロドプシタンパク質が正常に輸送されるためのメカニズムはマウスとショウジョウバエで異なっており、ショウジョウバエではロドプシンの輸送に発色団を必要とするが、マウスでは発色団である11-*cis*-retinalが必須ではないということを示唆している。

脊椎動物におけるロドプシンの輸送機構においては、ある程度明らかにされている。ロドプシンは他の膜タンパク質と同様に小胞体内に合成された後、ゴルジ体で修飾を受ける。これらの細胞小器官は視細胞の細胞体内にあり、合成されたロドプシンは視細胞内節を経由して視細胞外節に輸送される。ゴルジ体により修飾されたロドプシンは、トランスゴルジネットワーク (TGN) 膜より形成される rhodopsin transport carriers (RTCs) と呼ばれる小胞により外節へ輸送される⁴。TGNからRTCが形成される過程においてはsmall GTPaseであるrab6、rab11 およびARF4による調節が必要であり、ARF4はロドプシンのC末端領域に結合することでその役割を果たす^{57, 58}。そのため、ロドプシンのC末端領域に変異が生じると輸送障害が起き、ロドプシンは外節のほかに内節やシナプスにも局在するようになることがトランスジェニックラットやカエルの実験から知られている⁵⁹⁻⁶¹。一方、錐体オプシンの輸送機構については明らかになっていない。本実験では*Rpe65*^{-/-}マウスのロドプシンは正常に外節へ輸送されていたが、S-opsinは細胞体やシナプスにも局在しており、輸送異常が起きていた。これは、ロドプシンと錐体オプシンの輸送機構は異なっており、*Rpe65*をノックアウトすることで錐体オプシンの輸送に特異的に関与している因子が機能しなくなっている可能性を示唆している。

また、ロドプシンの遺伝子異常は網膜色素変性という遺伝性網膜変性疾患の原因であり、本疾患の発症により夜盲や視野障害の症状を呈する⁶²⁻⁶⁷。ロドプシンのC末端領域変異であるロドプシンS334terトランスジェニックラットでは、変異ロドプシンの輸送異常と細胞死の割合に相関があると報告されている⁶⁰。また、ロドプシン遺伝子欠損マウスに比べC末端変異ロドプシンを発現させたラットの方が網膜変性の進行が早いことから、変異ロドプシンの蓄積はアポトーシスを誘導し網膜変性を引き起こすと考えられている⁶⁸。本実験において3週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスのS-opsinは、ロドプシンのC末端領域に変異のある場合のような

局在異常を示しており、さらに糖鎖の切断が不完全であったが、S-opsinのmRNA発現量は減少しておらず、電子顕微鏡でも錐体細胞の細胞死は観察されなかった（図 5B, 7A, 17B）。これらの結果は、未成熟なS-opsinの発現および局在異常は、錐体視細胞死を誘導しないことを示唆している。そのため、ロドプシンのC末端変異により誘導される視細胞死は、ロドプシンの局在異常が原因ではなく、変異したロドプシンそのものによる細胞毒性が原因であるかもしれない。

4-2 *Rpe65*^{-/-}マウスにおけるM-opsinタンパク質の分解

リアルタイムRT-PCRの結果、3および5週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスのM-opsin mRNA発現量は、野生型マウスと比較して有意な差を認めなかった（図 5C）。しかしながら、免疫染色では*Rpe65*^{-/-}マウスのM-opsinはほとんど検出されず、ウェスタンブロッティングの結果でも野生型マウスに比べて顕著に低い発現量であった（図 3B, 6B）。これらの結果から、*Rpe65*^{-/-}マウスのM-opsinにおいてmRNAは正常に転写されるものの、タンパク質として翻訳された後に分解が生じていると考えられた。

11-*cis*-retinalはRPE65を經由して網膜色素上皮細胞から視細胞へ供給されること、11-*cis*-retinalはM-opsinのリガンドであることが知られている。*Rpe65*^{-/-}マウスにおいてM-opsinが分解してしまう理由の一つとして、RPE65遺伝子欠損により11-*cis*-retinalが視細胞内に供給されなくなることでM-opsinの安定性が低下してしまうことが原因であると推測した。この仮説を証明するために、①プロテアーゼ阻害剤処理によってM-opsinタンパク質の分解が抑制されるか、②11-*cis*-retinalのアナログである9-*cis*-retinal処理によってM-opsinタンパク質の分解が抑制されるかという2点について実験をおこなった。生体の眼球組織において硝子体液は常に還流しており、硝子体腔に薬剤を投与しても間もなく還流により薬剤濃度が低下してしまうことが考えられる。そのため、網膜に薬剤を一定期間、一定濃度処理するためには生体内よりも培養系が適切であると判断した。培養後の網膜組織は層構造に歪みを生じていた（図 8）。この歪みは、角膜を外して眼球を培養したために眼圧が存在せず、網膜組織が物理的に網膜色素上皮細胞側に圧迫されなくなるために生じたと考えられる。本実験では、リソソームおよびプロテアソームによるタンパク質分解を阻害する薬剤として過去に報告のある、pepstatin A、E64d、MG-132を用いた⁶⁹。pepstatin Aはアスパラギン酸プロテアーゼの可逆的阻害剤で、カテプシンD、レニンおよびペプシンを阻

害する。E64dはチオールプロテアーゼの阻害剤で、カテプシンB/H/Lおよびカルパインを阻害する。またMG-132はプロテアソーム阻害剤で、ユビキチン結合タンパク質の分解を抑制する。本研究において、3週齢の*Rpe65*^{-/-}マウス眼球に20 μM pepstatin A、30 μM E64d、10 μM MG-132の三種類を同時に24時間処理すると、M-opsinタンパク質の分解が抑制された（図 10）。さらに、30 μM E64dで24時間処理してもM-opsinタンパク質の分解は抑制されなかったが、10 μM MG-132で24時間処理するとM-opsinタンパク質の分解が抑制された（図 11, 12）。加えて、0.5 nM 9-*cis*-retinalで24時間処理してもM-opsinタンパク質の分解は抑制された（図 13）。これらの実験結果から、*Rpe65*^{-/-}マウスのM-opsinタンパク質は発色団である11-*cis*-retinalが結合していないために不安定で分解が促進されており、その分解経路には少なくともプロテアソーム系が関与していることが明らかとなった。

9-*cis*-retinalは熱、光、酸素に対して不安定であるため、培養で24時間インキュベートしている間に分解されている可能性がある。そのため、24時間よりも短い時間でサンプルを回収したほうがより9-*cis*-retinalの影響を正確に調べることができると考えたため、9-*cis*-retinal 処理後6時間および12時間においてもM-opsinの発現量を測定した。0.5 nM 9-*cis*-retinal処理後6時間および12時間でもコントロールに比べてM-opsinの発現が増加しており、分解の抑制が認められた（図 14A）。同様に5 μM MG-132処理後6時間および12時間でもコントロールに比べM-opsinの分解抑制が認められたが、0.5 nM 9-*cis*-retinal処理よりもM-opsinの分解を抑えることはできなかった（図 14B）。これらの結果は、*Rpe65*^{-/-}マウスのM-opsinは6時間以内に分解され、その分解経路にはプロテアソーム系以外の経路も存在していることを示唆している。また、培養後6時間、12時間、24時間と培養時間が長くなるに従ってGAPDHの発現量は減少していた（図 14A, B）。この現象から、培養時間が長くなることによって細胞が傷害される可能性が示唆された。

Rpe65^{-/-}マウスは視覚に必須である11-*cis*-retinal を合成できないため、視機能異常は11-*cis*-retinalを外部より供給することで改善されると考えられる。しかし、11-*cis*-retinalは温度と熱に非常に不安定なため、すぐに代謝されてしまう⁷⁰。そのため、11-*cis*-retinalを補う方法は最適ではない。そこでより安定な9-*cis*-retinalを用いる方法が検討されてきた。9-*cis*-retinalのロドプシンに対する親和性は11-*cis*-retinalに比べて劣るものの、9-*cis*-retinalを視物質として利用することで光感受が可能であることが知られている^{71,72}。*Rpe65*^{-/-}マウスに9-*cis*-retinalを投与す

ることで視機能が改善されるという報告がある^{38,73}。これは、枯渇した 11-*cis*-retinalの代わりに9-*cis*-retinalを補うことで視物質が供給されることに因るものと考えられる。さらに本実験結果（図 13, 14）から、9-*cis*-retinalを投与することで*Rpe65*^{-/-}マウスのM-opsinの分解が抑制されることが明らかとなった。これより、視機能の改善は9-*cis*-retinal投与による視物質の供給だけではなく、錐体視物質のタンパク質部分であるM-opsinそのものの分解を抑制していることも一因であると推察される。薬物治療に用いることを念頭において、さらに安定な状態に改良した9-*cis*-retinalの誘導体を投与した動物実験もおこなわれており、良好な結果が報告されている^{40,74}。今後、視サイクル異常の視覚障害に対して9-*cis*-retinalを投与するという治療法が検討されるかもしれない。

近年、*Lrat*^{-/-}マウスにおいて錐体系の光トランスダクション関連タンパク質であるcone-specific phosphodiesterase 6 α -subunit (PDE6 α ') やcone transducin α -subunit (T α) のタンパク質発現レベルが野生型マウスに比べ減少している一方、mRNA発現レベルには差がないことから、これらのタンパク質発現レベルの減少は翻訳後に分解されていると示唆するデータが報告された⁴⁶。*Rpe65*^{-/-}マウスと*Lrat*^{-/-}マウスに共通する特徴として11-*cis*-retinal欠損が挙げられる^{20,35}。これらの結果から、11-*cis*-retinalは錐体系の光トランスダクション関連タンパク質の正常な翻訳後調節と安定性に寄与していることが推測された。これら11-*cis*-retinal欠損マウスにおけるM-opsin、PDE6 α '、cone T α タンパク質の翻訳後分解のメカニズムについては明らかではないが、*Rpe65*^{-/-}マウスと*Lrat*^{-/-}マウスにおけるこれらのタンパク質分解の機構は似ているかもしれない。

4-3 *Rpe65*^{-/-}マウスにおけるロドプシンの発現機序

Feathersらの報告では、4週齢における*Rpe65*^{-/-}マウスのロドプシタンパク質の発現量は野生型に比べ減少していた⁷⁵。本研究の結果でも、3, 5, 7週齢における*Rpe65*^{-/-}マウスのロドプシタンパク質の発現量は野生型と比較してそれぞれ減少していた（図 6C）。さらにリアルタイムRT-PCRの結果、3, 5, 7週齢における*Rpe65*^{-/-}マウスのロドプシンのmRNA発現量はそれぞれ野生型に比べて有意な減少を認めた（図 5D）。これらの結果から、*Rpe65*^{-/-}マウスにおけるロドプシンのタンパク質量の減少はmRNA転写の過程で減少していることが示された。加えて、*Rpe65*^{-/-}マウスの視細胞においてアポトーシスを引き起こしている細胞は極めて少数であり、電子顕微鏡観察でも細胞死の所見を認めなかった（図 17, 予

備実験結果)。これより、*Rpe65*^{-/-}マウスで見られたロドプシンmRNAの発現量減少は細胞死に伴うものではなく、ロドプシンmRNAの転写が直接制御されたことでmRNA発現が減少したと考えられる。このことは、マウスにおけるロドプシンmRNAの転写発現には11-*cis*-retinalが関与していることを示唆している。しかしながら、Huberらは、ショウジョウバエにおいて発色団はオプシンのmRNA転写を調節しないことを報告した⁴⁹。これらの実験結果の違いは、ロドプシンmRNA発現の調節機構はマウスとショウジョウバエで異なっており、マウスでは発色団である11-*cis*-retinalを必要とするがショウジョウバエでは必須ではないということを示唆している。

4-4 *Rpe65*^{-/-}マウスにおける錐体細胞の変性様式

過去の論文において、*Rpe65*^{-/-}マウスは3週齢において錐体細胞のマーカであるPNAレクチン染色陽性細胞数が減少していることから、錐体細胞の消失が起きていると示唆している報告がある^{41,46}。しかしながら本研究において、錐体細胞のマーカであるS-opsinおよびM-opsinのmRNA発現量は3週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスでは有意な減少は認められなかった(図5A, B)。この結果から、3週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスでは錐体細胞は細胞死を起こしていないことが予想された。そのため、*Rpe65*^{-/-}マウスで実際に細胞死が誘導されているかどうかを直接調べるために、TUNEL法によりアポトーシス細胞を検出した。視神経を基準に50 μm間隔で切片を作製し一視野あたり30枚の切片をTUNEL染色することで、できるだけ眼球を広範囲に調べた。視細胞のアポトーシス細胞数を調べるため、外顆粒層でのTUNEL陽性細胞数を計測した。3, 5および7週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスはいずれも網膜上方と網膜下方でのアポトーシス細胞数に大きな差は見られなかった。3週齢から7週齢にかけてアポトーシス細胞数はわずかに増加傾向が見られたが、アポトーシス細胞数は網膜上方と下方合わせても3週齢で切片あたり約1.5個、7週齢でも切片あたり約3.5個であり、検出された視細胞のアポトーシス細胞数はごくわずかであった(予備実験結果)。これより、マウス網膜の視細胞に11-*cis*-retinalが供給されなくともアポトーシスはほとんど生じないことが判明した。

しかしながら、*Rpe65*^{-/-}マウスではネクローシスのようにTUNEL法では検出できないアポトーシス以外の細胞死が起きている可能性も考えられる。そのため、電子顕微鏡にて視細胞の微細構造を観察した。3週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスでは外節

の構造が崩壊している様子が見られ、5週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスでは崩壊した外節がより多く観察され変性が進行していると考えられた（図 15）。しかしながら*Rpe65*^{-/-}マウスの内節構造に特に異常は見られず（図 16）、視細胞核もアポトーシスおよびネクローシスを呈する像は観察されなかった（図 17）。これらの結果から、若齢の*Rpe65*^{-/-}マウスは外節が崩壊しているものの錐体細胞は細胞死には至っておらず、そのために錐体オプシンのmRNA発現量は比較的保たれていると考えられた。PNAは錐体細胞の外節および内節に発現する細胞外マトリックスの糖鎖を認識するレクチンである。過去の報告において*Rpe65*^{-/-}マウスにおけるPNAレクチン染色陽性細胞数が減少していたのは、錐体細胞が細胞死を起こしていたためではなく錐体細胞の外節が崩壊してPNAと反応する糖鎖が減少していることが原因であると推測される。

本研究の結果において、*Rpe65*^{-/-}マウスのS-opsinは局在が異常であり外節に正常に輸送されていないものがあり、またM-opsinは分解されており外節ではほとんど検出されなかった（図 2A, B）。外節内には多数の円盤状構造があり、その構造を構成するタンパク質の大部分はオプシンである。*Rpe65*^{-/-}マウスにおいて外節構造が崩壊している原因は、錐体オプシンの輸送障害やオプシタンパク質そのものの分解により、外節を構成するオプシタンパク質が正常に供給されないためであると推察される。

4-5 *Rpe65*^{-/-}マウスにおけるS-opsinの発現分布

7週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスの網膜上方において、S-opsin陽性細胞数は野生型マウスに比べ有意に増加していた（*Rpe65*^{-/-}マウス：約500細胞数/視野 vs 野生型マウス：約200細胞数/視野）（図 4C, D）。一方、7週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスの網膜下方においては、S-opsin陽性細胞数は野生型マウスに比べ有意に減少していた

（*Rpe65*^{-/-}マウス：約250細胞数/視野 vs 野生型マウス：約1200細胞数/視野）（図 4A, B）。そのため、7週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスの網膜全体におけるS-opsin陽性細胞数は減少していると考えられることから、S-opsinのmRNA発現量も野生型に比べ減少していると推測される（図 5B）。

マウスにおける錐体オプシンの発現パターンには、網膜内で勾配が存在することが報告されている。S-opsinの発現は網膜下方で多く、M-opsinは網膜上方で高い発現レベルを示すことが報告されている^{2, 56}。網膜下方において、3週齢では*Rpe65*^{-/-}マウスと野生型ではS-opsin陽性細胞数は有意な差を認めなかったが、5

および7週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスでは野生型マウスに比較して有意に減少していた (図 4A, B)。これらの結果は、*Rpe65*^{-/-}マウスの網膜下方において、S型-錐体細胞が3週齢から5週齢にかけて視細胞外節に存在するS-opsinが減少していることを示唆している。興味深いことに本実験では、*Rpe65*^{-/-}マウスの網膜上方においてS-opsin陽性細胞は野生型マウスに比べて有意に上昇していた (図 4C, D)。この現象はretinoid X receptor γ (RXR γ) 欠損マウスで見られる現象と良く似ている。RXR γ とthyroid hormone receptor β 2 (TR β 2) はヘテロダイマーを形成して網膜上方でのS-opsinの発現を抑制的に調節することで、網膜内におけるS-opsin発現パターンの勾配を形成している⁷⁶。RXR γ のリガンドとして9-*cis*-retinoic acidやpolyunsaturated fatty acid docosahexanoic acidが報告されている^{77,78}。しかし、主要な視サイクルにより供給される因子でRXR γ のリガンドとなるものは報告されていない。マウス網膜において視サイクル内でRPE65を経由して供給されるレチノイドも内在性のRXR γ のリガンドとして働いているのであれば、*Rpe65*^{-/-}マウスの網膜上方ではRXR γ のリガンドが供給されずS-opsinを抑制的に調節するシグナルが入らないために、網膜上方においてS-opsin陽性細胞数が増加しているのかもしれない (図 18)。

4-6 総合考察

今回の実験結果から、マウスの視細胞およびオプシンにおける11-*cis*-retinalの新たな役割が解明された。11-*cis*-retinalは錐体オプシンに結合することにより、S-opsinタンパク質に対しては正常な糖鎖切断や外節への輸送に、M-opsinタンパク質に対しては分解を抑制するために働いており、錐体オプシンタンパク質の成熟や輸送および安定性に寄与していることが明らかとなった。また、視細胞外節が正常に構築されるためには、11-*cis*-retinalがオプシンタンパク質を正常に制御することが必要であることも示された。また、これらの結果はRPE65遺伝子異常における視細胞変性機序の解明に重要な示唆を与えるものであると考えられた。

Rpe65^{-/-}マウスは若齢時から錐体オプシンのタンパク質発現に異常を認めた。S-opsinは分子量が大きく糖鎖切断が不完全であり、野生型では観察されない視細胞核やシナプス層にも局在を認めた。*Rpe65*^{-/-}マウスのS-opsinは3週齢では視細胞外節にも多く存在しているが、5週齢では外節に局在するS-opsinは大幅に減少していた。一方、*Rpe65*^{-/-}マウスのM-opsinは若齢時では野生型と同程度の

mRNA発現を認めるもののタンパク質は急速に分解されており、視細胞外節にも局在はほとんど観察されなかった。さらに*Rpe65*^{-/-}マウスのロドプシンは若齢時よりmRNA発現の減少を認め、それに伴いタンパク質発現の減少も認められたが、局在は正常であり*Rpe65*^{-/-}マウスのロドプシンは若齢時でも成体でも視細胞外節に局限していた。*Rpe65*^{-/-}マウスは3週齢で視細胞外節の形態異常が観察され、5週齢ではさらに外節の崩壊が進行していた。しかしながら、アポトーシスやネクローシスなどの細胞死はほとんど観察されなかった。これらの結果は、外節の主要な構成成分であるオプシンタンパク質が外節に存在する量が減少することにより、外節が正常に構築できず崩壊してしまうが、7週齢の時点では外節に存在するオプシンが野生型に比べて減少しても細胞死に至らないことを示唆している。一方、24週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスではTUNEL染色陽性の視細胞が観察され、Bax依存的なアポトーシス経路で細胞死が誘導されていることが報告されている⁷⁹。これらは、*Rpe65*^{-/-}マウスで視細胞死が起きる時期は非常に遅く、視細胞変性の進行は緩慢であると考えられる。そのため、本研究により観察された結果は*Rpe65*^{-/-}マウスにおける視細胞変性の初期段階であり、錐体オプシンが翻訳後の過程で、ロドプシンがmRNA転写レベルで正常に制御されないために、細胞死に先立って顕著な外節の崩壊が誘発されていることが推測された。本研究により得られた結果は、高等動物の視覚形成を司る分子であるオプシンと11-*cis*-retinalの関わりについて新たな知見をもたらし、さらに難治性疾患であるRPE65遺伝子異常における視細胞変性機構を解明するための重要なヒントになり得ると期待される。

5. 引用文献

1. Carroll J. Focus on molecules: the cone opsins. *Exp Eye Res* 2008;86:865-866.
2. Applebury ML, Antoch MP, Baxter LC, et al. The murine cone photoreceptor: a single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. *Neuron* 2000;27:513-523.
3. Carter-Dawson LD, LaVail MM. Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 1979;188:245-262.
4. Deretic D. A role for rhodopsin in a signal transduction cascade that regulates membrane trafficking and photoreceptor polarity. *Vision Res* 2006;46:4427-4433.
5. Palczewski K. G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu Rev Biochem* 2006;75:743-767.
6. Hargrave PA, McDowell JH. Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB J* 1992;6:2323-2331.
7. Ritter E, Elgeti M, Bartl FJ. Activity switches of rhodopsin. *Photochem Photobiol* 2008;84:911-920.
8. Menon ST, Han M, Sakmar TP. Rhodopsin: structural basis of molecular physiology. *Physiol Rev* 2001;81:1659-1688.
9. Nathans J. Rhodopsin: structure, function, and genetics. *Biochemistry* 1992;31:4923-4931.
10. Arshavsky VY, Pugh EN, Jr. Lifetime regulation of G protein-effector complex: emerging importance of RGS proteins. *Neuron* 1998;20:11-14.
11. Lagnado L, Baylor D. Signal flow in visual transduction. *Neuron* 1992;8:995-1002.
12. Mendez A, Burns ME, Roca A, et al. Rapid and reproducible deactivation of rhodopsin requires multiple phosphorylation sites. *Neuron* 2000;28:153-164.
13. Crouch RK, Chader GJ, Wiggert B, Pepperberg DR. Retinoids and the visual process. *Photochem Photobiol* 1996;64:613-621.
14. Wald G. The molecular basis of visual excitation. *Nature* 1968;219:800-807.
15. Rando RR. Molecular mechanisms in visual pigment regeneration. *Photochem Photobiol* 1992;56:1145-1156.
16. Rando RR. The biochemistry of the visual cycle. *Chem Rev* 2001;101:1881-1896.
17. Maeda T, Maeda A, Ohguro H. [Retinal degeneration diseases and the retinoid cycle]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2009;113:83-94.

18. Maeda A, Maeda T, Sun W, Zhang H, Baehr W, Palczewski K. Redundant and unique roles of retinol dehydrogenases in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19565-19570.
19. Saari JC, Nawrot M, Garwin GG, et al. Analysis of the visual cycle in cellular retinol-binding protein type I (CRBPI) knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1730-1735.
20. Batten ML, Imanishi Y, Maeda T, et al. Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *J Biol Chem* 2004;279:10422-10432.
21. Moiseyev G, Crouch RK, Goletz P, Oatis J, Jr., Redmond TM, Ma JX. Retinyl esters are the substrate for isomerohydrolase. *Biochemistry* 2003;42:2229-2238.
22. Moiseyev G, Chen Y, Takahashi Y, Wu BX, Ma JX. RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12413-12418.
23. Jin M, Li S, Moghrabi WN, Sun H, Travis GH. Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell* 2005;122:449-459.
24. Redmond TM, Poliakov E, Yu S, Tsai JY, Lu Z, Gentleman S. Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13658-13663.
25. Kim TS, Maeda A, Maeda T, et al. Delayed dark adaptation in 11-cis-retinol dehydrogenase-deficient mice: a role of RDH11 in visual processes in vivo. *J Biol Chem* 2005;280:8694-8704.
26. Gu SM, Thompson DA, Srikumari CR, et al. Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 1997;17:194-197.
27. Marlhens F, Bareil C, Griffoin JM, et al. Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* 1997;17:139-141.
28. Marlhens F, Griffoin JM, Bareil C, Arnaud B, Claustres M, Hamel CP. Autosomal recessive retinal dystrophy associated with two novel mutations in the RPE65 gene. *Eur J Hum Genet* 1998;6:527-531.
29. Morimura H, Fishman GA, Grover SA, Fulton AB, Berson EL, Dryja TP. Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or leber congenital amaurosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3088-3093.
30. Lorenz B, Gyurus P, Preising M, et al. Early-onset severe rod-cone dystrophy in

- young children with RPE65 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2735-2742.
31. Phelan JK, Bok D. A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Mol Vis* 2000;6:116-124.
 32. Thompson DA, Gyurus P, Fleischer LL, et al. Genetics and phenotypes of RPE65 mutations in inherited retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4293-4299.
 33. Harris EW. Leber's congenital amaurosis and RPE65. *Int Ophthalmol Clin* 2001;41:73-82.
 34. Thompson DA, Gal A. Genetic defects in vitamin A metabolism of the retinal pigment epithelium. *Dev Ophthalmol* 2003;37:141-154.
 35. Redmond TM, Yu S, Lee E, et al. Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet* 1998;20:344-351.
 36. Seeliger MW, Grimm C, Stahlberg F, et al. New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 2001;29:70-74.
 37. Ablonczy Z, Crouch RK, Goletz PW, et al. 11-cis-retinal reduces constitutive opsin phosphorylation and improves quantum catch in retinoid-deficient mouse rod photoreceptors. *J Biol Chem* 2002;277:40491-40498.
 38. Van Hooser JP, Liang Y, Maeda T, et al. Recovery of visual functions in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *J Biol Chem* 2002;277:19173-19182.
 39. Jacobson SG, Aleman TS, Cideciyan AV, et al. Human cone photoreceptor dependence on RPE65 isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15123-15128.
 40. Maeda T, Cideciyan AV, Maeda A, et al. Loss of cone photoreceptors caused by chromophore depletion is partially prevented by the artificial chromophore pro-drug, 9-cis-retinyl acetate. *Hum Mol Genet* 2009;18:2277-2287.
 41. Znoiko SL, Rohrer B, Lu K, Lohr HR, Crouch RK, Ma JX. Downregulation of cone-specific gene expression and degeneration of cone photoreceptors in the Rpe65^{-/-} mouse at early ages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1473-1479.
 42. Cottet S, Michaut L, Boisset G, Schlecht U, Gehring W, Schorderet DF. Biological characterization of gene response in Rpe65^{-/-} mouse model of Leber's congenital amaurosis during progression of the disease. *FASEB J* 2006;20:2036-2049.
 43. Rohrer B, Lohr HR, Humphries P, Redmond TM, Seeliger MW, Crouch RK. Cone opsin mislocalization in Rpe65^{-/-} mice: a defect that can be corrected by 11-cis retinal.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46:3876-3882.

44. Fan J, Rohrer B, Frederick JM, Baehr W, Crouch RK. Rpe65^{-/-} and Lrat^{-/-} mice: comparable models of leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2384-2389.
45. Thompson DA, Li Y, McHenry CL, et al. Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 2001;28:123-124.
46. Zhang H, Fan J, Li S, et al. Trafficking of membrane-associated proteins to cone photoreceptor outer segments requires the chromophore 11-cis-retinal. *J Neurosci* 2008;28:4008-4014.
47. Colley NJ, Baker EK, Starnes MA, Zuker CS. The cyclophilin homolog ninaA is required in the secretory pathway. *Cell* 1991;67:255-263.
48. Ozaki K, Nagatani H, Ozaki M, Tokunaga F. Maturation of major Drosophila rhodopsin, ninaE, requires chromophore 3-hydroxyretinal. *Neuron* 1993;10:1113-1119.
49. Huber A, Wolfrum U, Paulsen R. Opsin maturation and targeting to rhabdomeral photoreceptor membranes requires the retinal chromophore. *Eur J Cell Biol* 1994;63:219-229.
50. St Jules RS, Wallingford JC, Smith SB, O'Brien PJ. Addition of the chromophore to rat rhodopsin is an early post-translational event. *Exp Eye Res* 1989;48:653-665.
51. Znoiko SL, Crouch RK, Moiseyev G, Ma JX. Identification of the RPE65 protein in mammalian cone photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1604-1609.
52. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
53. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4354.
54. Wilson RB, Kunchithapautham K, Rohrer B. Paradoxical role of BDNF: BDNF^{+/-} retinas are protected against light damage-mediated stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2877-2886.
55. Simpson DA, Feeney S, Boyle C, Stitt AW. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis* 2000;6:178-183.

56. Rohlich P, van Veen T, Szel A. Two different visual pigments in one retinal cone cell. *Neuron* 1994;13:1159-1166.
57. Deretic D, Puleo-Schepke B, Trippe C. Cytoplasmic domain of rhodopsin is essential for post-Golgi vesicle formation in a retinal cell-free system. *J Biol Chem* 1996;271:2279-2286.
58. Deretic D, Williams AH, Ransom N, Morel V, Hargrave PA, Arendt A. Rhodopsin C terminus, the site of mutations causing retinal disease, regulates trafficking by binding to ADP-ribosylation factor 4 (ARF4). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3301-3306.
59. Sung CH, Makino C, Baylor D, Nathans J. A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment. *J Neurosci* 1994;14:5818-5833.
60. Green ES, Menz MD, LaVail MM, Flannery JG. Characterization of rhodopsin mis-sorting and constitutive activation in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1546-1553.
61. Tam BM, Moritz OL, Hurd LB, Papermaster DS. Identification of an outer segment targeting signal in the COOH terminus of rhodopsin using transgenic *Xenopus laevis*. *J Cell Biol* 2000;151:1369-1380.
62. Bhattacharya S, Lester D, Keen J, et al. Retinitis pigmentosa and mutations in rhodopsin. *Lancet* 1991;337:185.
63. Dryja TP, McGee TL, Hahn LB, et al. Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *N Engl J Med* 1990;323:1302-1307.
64. Dryja TP, McGee TL, Reichel E, et al. A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 1990;343:364-366.
65. Sung CH, Davenport CM, Nathans J. Rhodopsin mutations responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Clustering of functional classes along the polypeptide chain. *J Biol Chem* 1993;268:26645-26649.
66. Sung CH, Schneider BG, Agarwal N, Papermaster DS, Nathans J. Functional heterogeneity of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:8840-8844.
67. Farrar GJ, Kenna PF, Humphries P. On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *EMBO J*

2002;21:857-864.

68. Lee ES, Flannery JG. Transport of truncated rhodopsin and its effects on rod function and degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2868-2876.
69. Komatsu M, Waguri S, Koike M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 2007;131:1149-1163.
70. Moise AR, Noy N, Palczewski K, Blaner WS. Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. *Biochemistry* 2007;46:4449-4458.
71. Pepperberg DR, Brown PK, Lurie M, Dowling JE. Visual pigment and photoreceptor sensitivity in the isolated skate retina. *J Gen Physiol* 1978;71:369-396.
72. Maeda A, Maeda T, Golczak M, et al. Effects of potent inhibitors of the retinoid cycle on visual function and photoreceptor protection from light damage in mice. *Mol Pharmacol* 2006;70:1220-1229.
73. Van Hooser JP, Aleman TS, He YG, et al. Rapid restoration of visual pigment and function with oral retinoid in a mouse model of childhood blindness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8623-8628.
74. Maeda T, Maeda A, Leahy P, Saperstein DA, Palczewski K. Effects of long-term administration of 9-cis-retinyl acetate on visual function in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:322-333.
75. Feathers KL, Lyubarsky AL, Khan NW, et al. Nrl-knockout mice deficient in Rpe65 fail to synthesize 11-cis retinal and cone outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1126-1135.
76. Roberts MR, Hendrickson A, McGuire CR, Reh TA. Retinoid X receptor (gamma) is necessary to establish the S-opsin gradient in cone photoreceptors of the developing mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2897-2904.
77. Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, et al. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 1992;68:397-406.
78. de Urquiza AM, Liu S, Sjoberg M, et al. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 2000;290:2140-2144.
79. Hamann S, Schorderet DF, Cottet S. Bax-induced apoptosis in Leber's congenital amaurosis: a dual role in rod and cone degeneration. *PLoS One* 2009;4:e6616.
80. Ng L, Hurley JB, Dierks B, et al. A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat Genet* 2001;27:94-98.

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
RPE65	ATGATCGAGAAGAGGATTGTC	CTGCTTTCAGTGGAGGGATC
S-opsin	TGTACATGGTCAACAATCGGA	ACACCATCTCCAGAATGCAAG
M-opsin	CTCTGCTACCTCCAAGTGTGG	AAGTATAGGGTCCCCAGCAGA
Rhodopsin	CAAGAATCCACTGGGAGATGA	GTGTGTGGGGACAGGAGACT
β -actin	GCTACAGCTTCACCACCACA	TCTCCAGGGAGGAAGAGGAT

表 1. RT-PCR のプライマー配列。

Antibody	Dilution for WB	Dilution for IHC	Company	Catlog No.
1st antibody				
mouse anti-RPE65	1:5000	1:200	Chemicon	MAB5428
goat anti-S-opsin	1:5000	1:200	Santa cruz	sc-14363
rabbit anti-M-opsin	1:5000	1:1000	Chemicon	AB5405
mouse anti-Rhodopsin	1:10000	1:4000	Chemicon	MAB5316
rabbit anti-GAPDH	1:10000	-	Abcam	ab36840
2nd antibody				
rabbit anti-mouse IgG-HRP	1:5000	1:200 or 1:800	DAKO	P0260
rabbit anti-goat IgG-HRP	1:5000	1:200	DAKO	P0160
goat anti-rabbit IgG-HRP	1:5000	1:200	DAKO	P0448

表 2. ウェスタンブロッティングおよび免疫染色に使用した抗体の希釈倍率。

ロドプシンの免疫染色時のみ二次抗体を 1:800 で使用した。

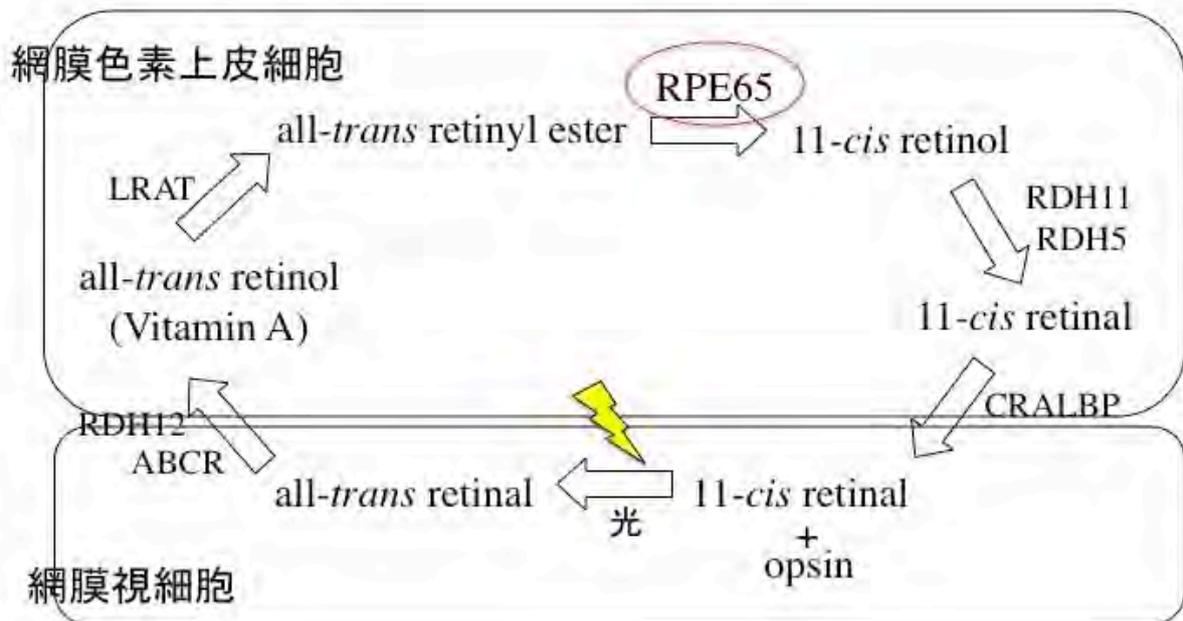


図 1. 視細胞と網膜色素上皮細胞間における視サイクル。

RPE65 は網膜色素上皮細胞内に発現し、all-*trans*-retinyl ester から 11-*cis*-retinol への異性化を触媒する酵素である。RPE65 欠損により 11-*cis*-retinol および 11-*cis*-retinal の供給が途絶える。

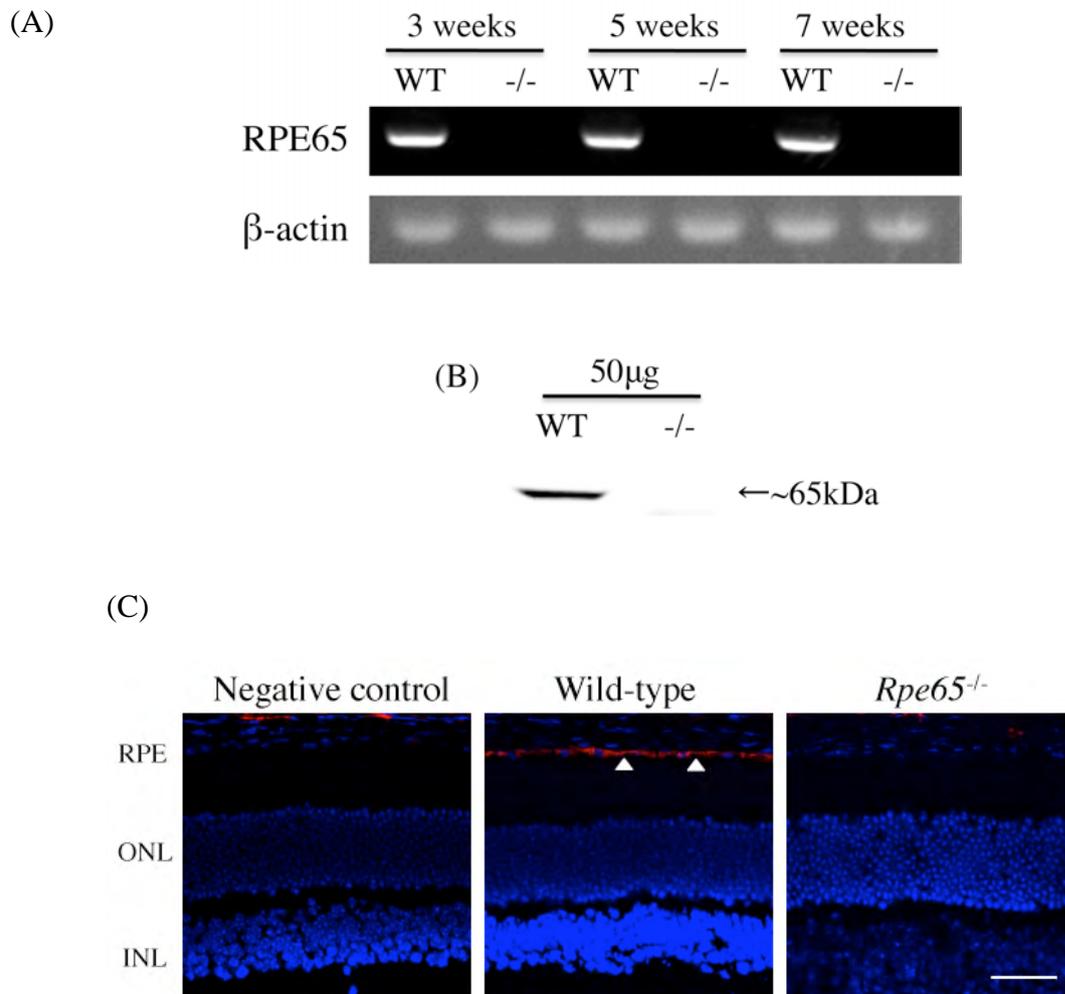


図2. 野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウスにおける RPE65 発現。

RT-PCR による RPE65 の mRNA 発現 (A) およびウェスタンブロッティングによるタンパク質発現の確認 (B)。免疫組織化学による RPE65 の局在確認 (C)。RPE65 を赤 (矢頭) で、核を青 (DAPI) で示した。Negative control には一次抗体の代わりに正常マウス IgG を用いた。RPE; 網膜色素上皮細胞, ONL; 外顆粒層, INL; 内顆粒層。スケールバーは 50 μ m。

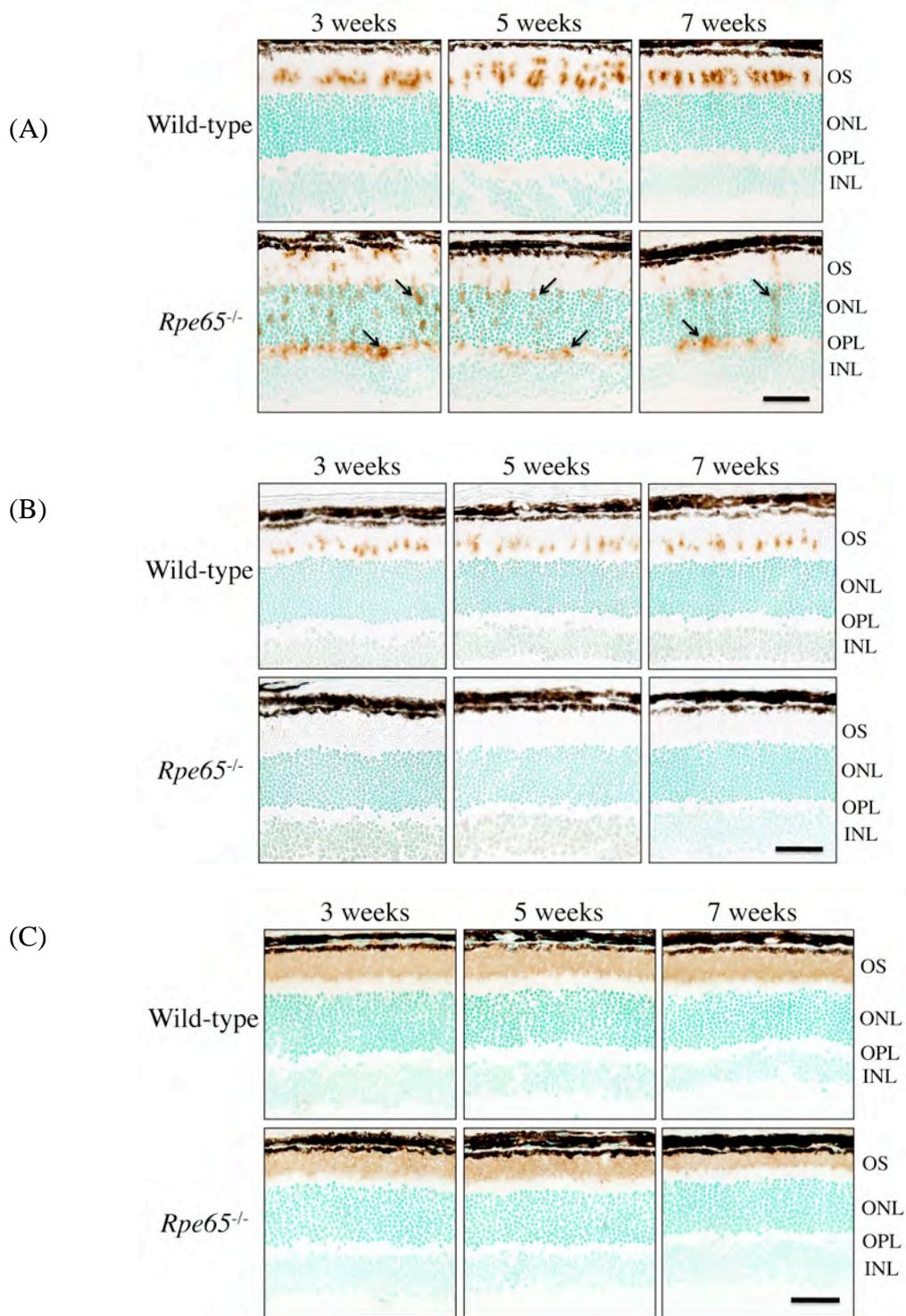


図3. 野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウスにおけるオプシンの局在。

免疫組織化学により S-opsin (A)、M-opsin (B) およびロドプシン (C) の網膜内局在を褐色で示した。*Rpe65*^{-/-}マウスの S-opsin は ONL や OPL に異常な局在を認めた (矢印)。一方、*Rpe65*^{-/-}マウスの M-opsin はほとんど検出されなかった。*Rpe65*^{-/-}マウスにおけるロドプシンの局在は正常であった。OS; 視細胞外節, ONL; 外顆粒層, OPL; 外網状層, INL; 内顆粒層。スケールバーは 100 μm。

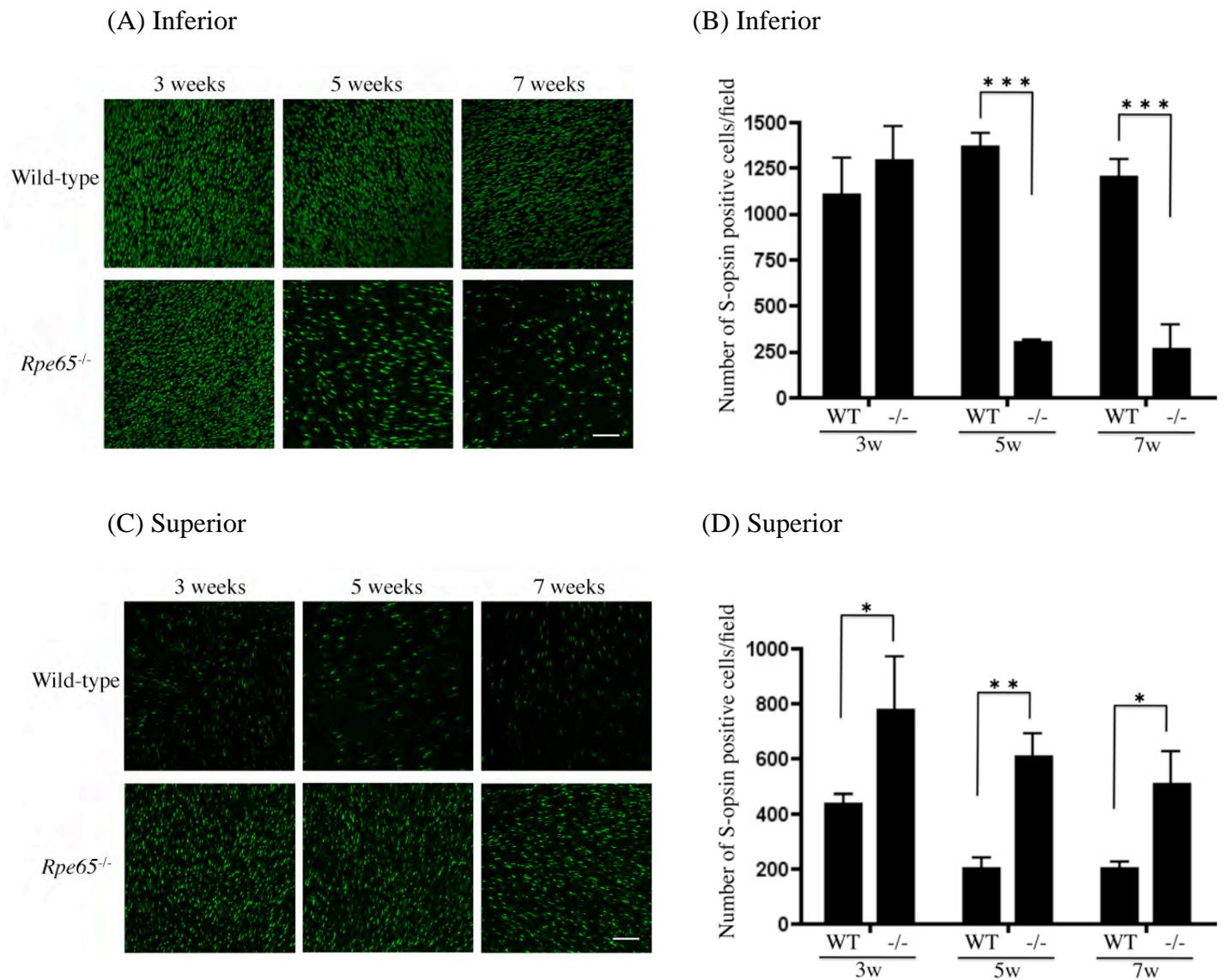


図4. 野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウス網膜内における S-opsin の分布。

網膜フラットマウントを作製し、抗 S-opsin 抗体を用いて S 型-錐体細胞を蛍光染色した。400 倍で撮影した網膜下方 (A) および網膜上方 (C) の視細胞外節の写真をそれぞれ示した。網膜一枚あたり網膜下方および網膜上方それぞれ 4 箇所を無作為に選び、S-opsin 陽性細胞数を計測し網膜下方 (B) と網膜上方 (D) についてグラフで示した。グラフは Mean±SD/視野 (n=3) で示した。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。スケールバーは 50 μm。

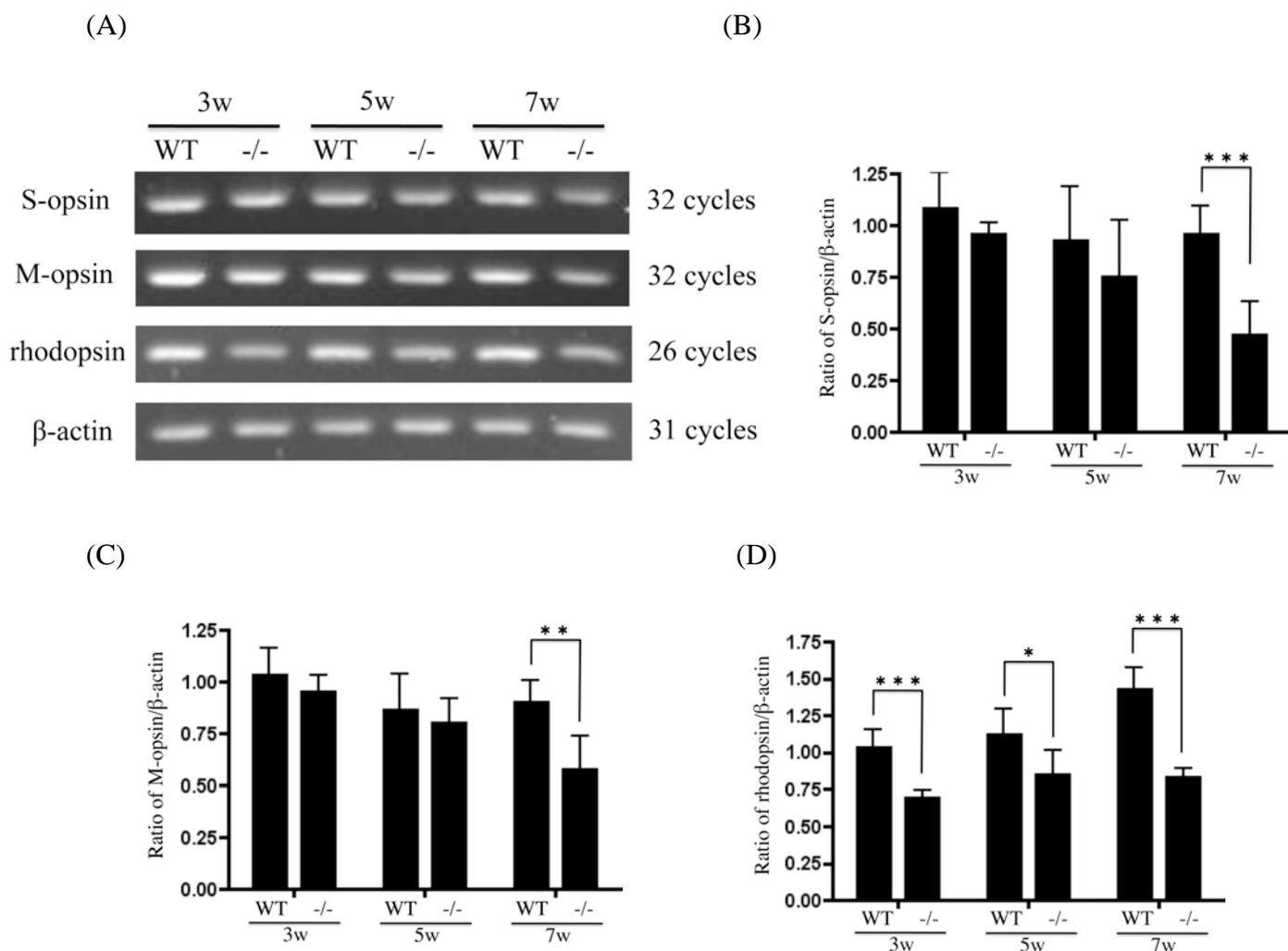
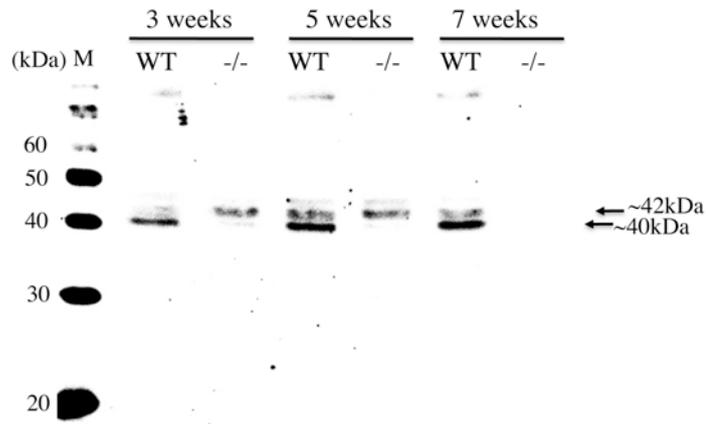


図5. 野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウスにおける錐体オプシンおよびロドプシンの mRNA 発現量測定。

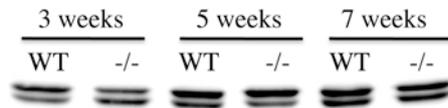
リアルタイム RT-PCR 産物を 1.5%アガロースゲルにより電気泳動し臭化エチジウムで染色し可視化した (A)。リアルタイム RT-PCR により S-opsin (B)、M-opsin (C)、rhodopsin (D) の mRNA 発現量を半定量解析し、β-actin により発現量を補正した。グラフは Mean±SD (n=6) で示した。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

(A)

<S-opsin >

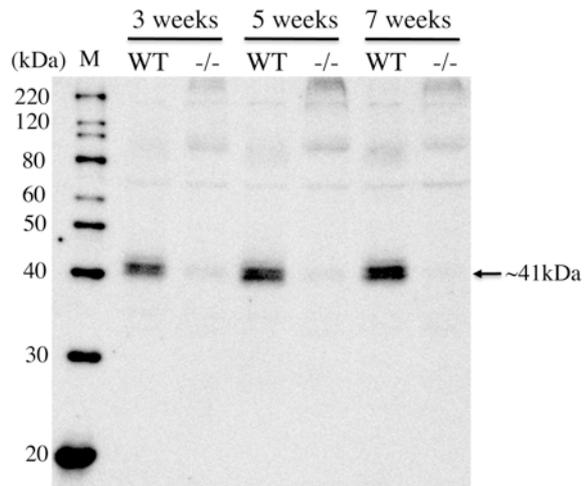


<GAPDH>

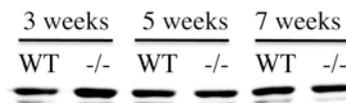


(B)

<M-opsin >

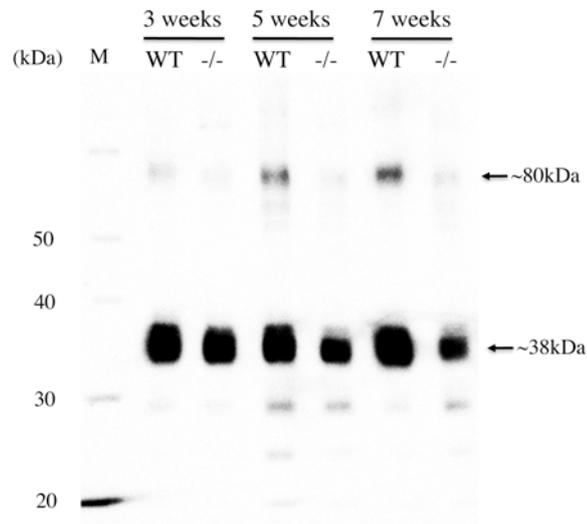


<GAPDH>



(C)

<rhodopsin>



<GAPDH>

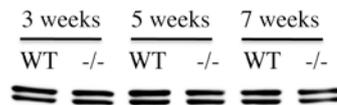
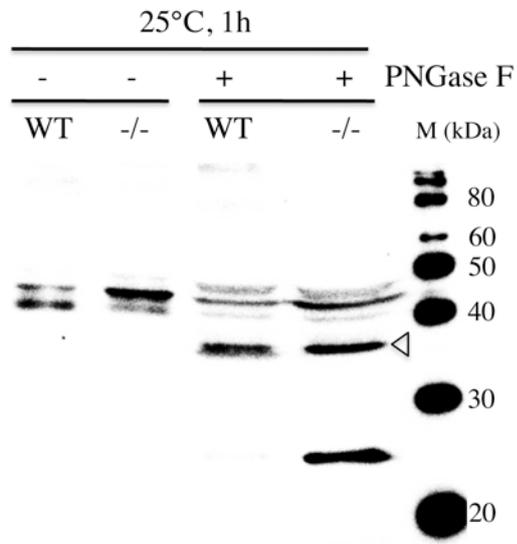


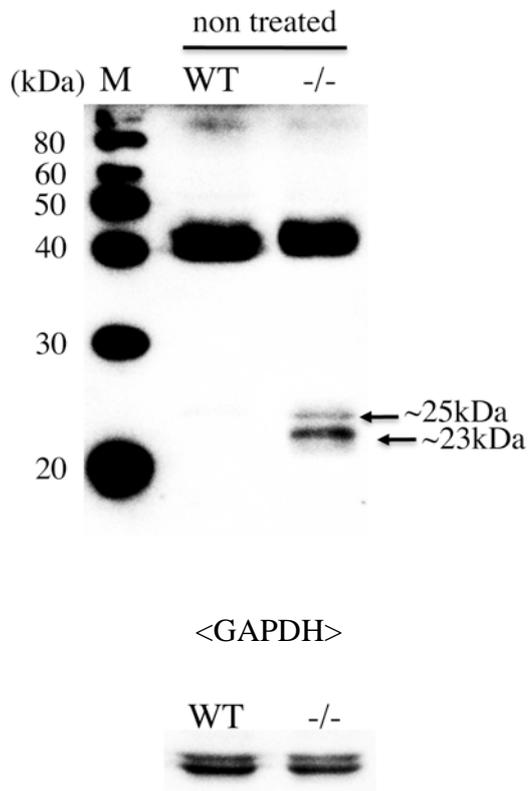
図6. 野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウスにおける錐体オプシンおよびロドプシンのタンパク質発現解析。

網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜をサンプルとし、S-opsin (A)、M-opsin (B)、rhodopsin (C) それぞれのタンパク質をウェスタンブロッティングにより検出した。*Rpe65*^{-/-}マウスの S-opsin は野生型で見られた 40 kDa のバンドが観察されず、42 kDa にのみバンドを認めた (A)。*Rpe65*^{-/-}マウスの M-opsin は野生型に比べ非常に少ない発現量であった (B)。*Rpe65*^{-/-}マウスの rhodopsin は成育につれて発現量が徐々に減少していた (C)。Loading control として GAPDH を検出した。M; 分子量マーカー。サンプルは 10 μ g/Lane (A)、5 μ g/Lane (B)、rhodopsin 検出に 0.5 μ g/Lane、GAPDH 検出に 5 μ g/Lane (C) をアプライした。

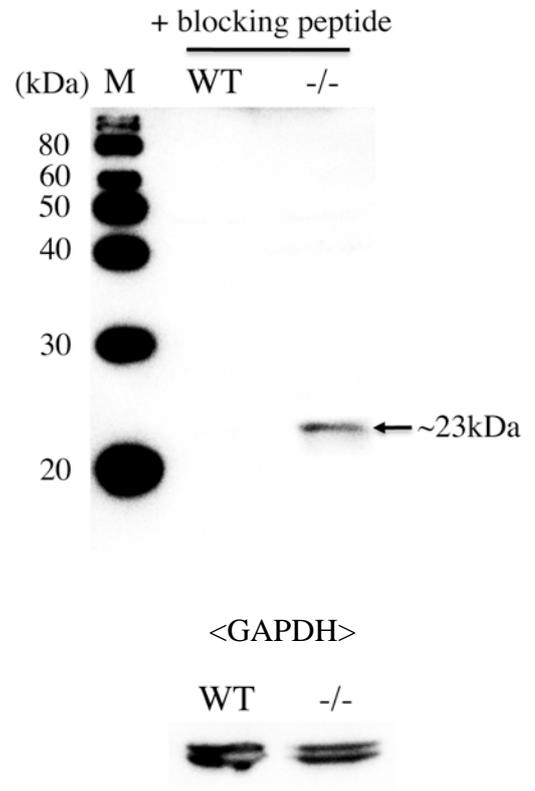
(A)



(B)



(C)



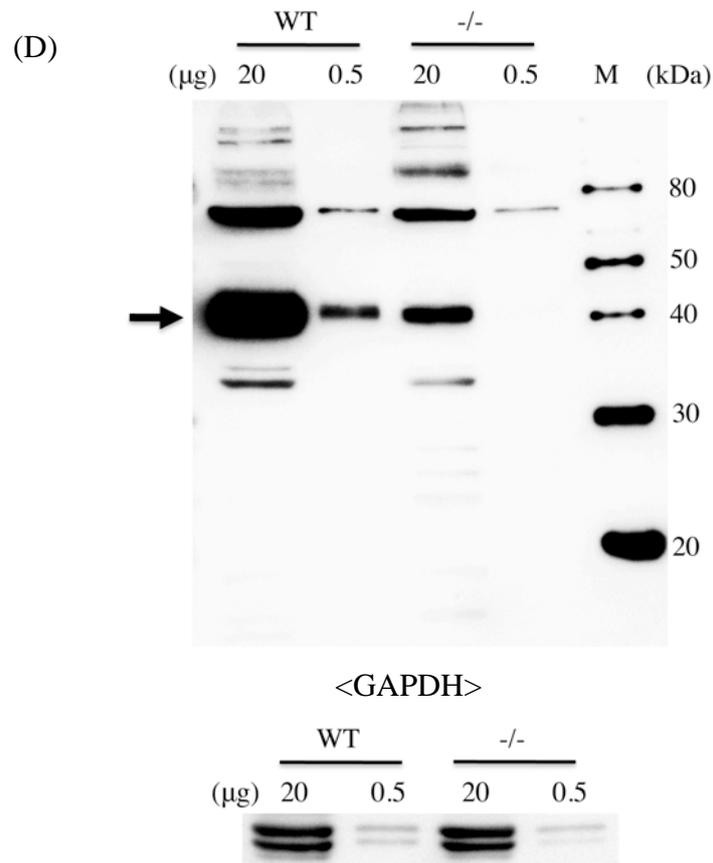


図7. *Rpe65*^{-/-}マウスにおける錐体オプシンの翻訳後修飾。

ウェスタンブロッティングにより脱糖鎖前後の S-opsin を検出した (A)。3 週齢のマウスの網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜をサンプルとし、材料と方法の項に従って PNGase F で 25°C、1 時間処理をした。PNGase F 処理により脱糖鎖された S-opsin は野生型マウスおよび *Rpe65*^{-/-}マウスでどちらも約 35 kDa に検出された (A, 矢頭)。高感度な条件で S-opsin を検出すると *Rpe65*^{-/-}マウスでは約 25 kDa と約 23 kDa にバンドが検出され (B)、一次抗体を吸収するブロッキングペプチドにより約 25 kDa のバンドのみが消失した (C)。また、*Rpe65*^{-/-}マウスの M-opsin を検出するために高感度な条件でウェスタンブロッティングをおこなった (D)。*Rpe65*^{-/-}マウスの M-opsin タンパク質の移動度は野生型マウスとほぼ同じであった (D, 矢印)。それぞれのウェスタンブロッティングでは loading control として GAPDH を検出した。

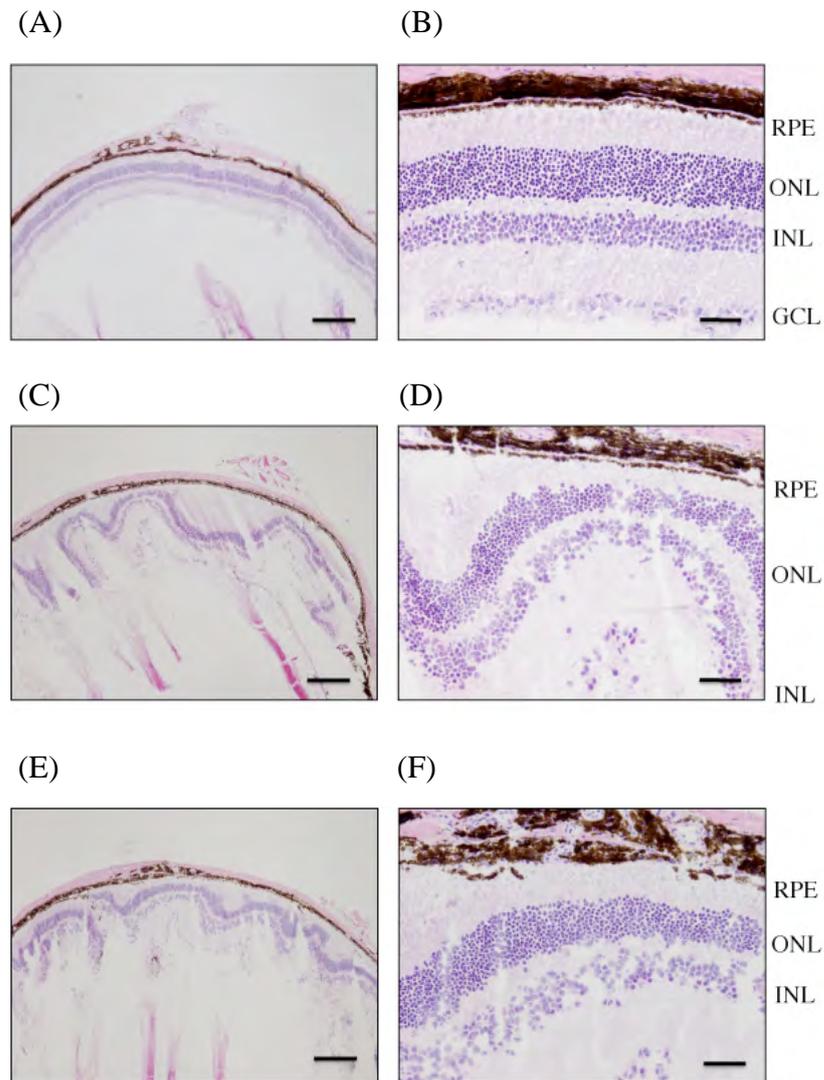


図 8. 眼球培養後の網膜組織切片。

野生型マウスの眼球を 50% DMEM, 25% FBS, 25% HBSS の培地で培養前 (A, B)、12 時間培養後 (C, D)、24 時間培養後 (E, F) に凍結切片を作製し、HE 染色をおこなった。光学顕微鏡を用い 40 倍 (A, C, E) および 200 倍 (B, D, F) にて観察した。培養前では網膜層は整然とした三層構造を形成していた。培養することにより網膜層構造の歪みを認めるが、細胞密度は比較的保たれていた。RPE; 網膜色素上皮細胞, ONL; 外顆粒層, INL; 内顆粒層, GCL; ガングリオン細胞層。スケールバーは 500 μm (A, C, E) および 100 μm (B, D, F)。

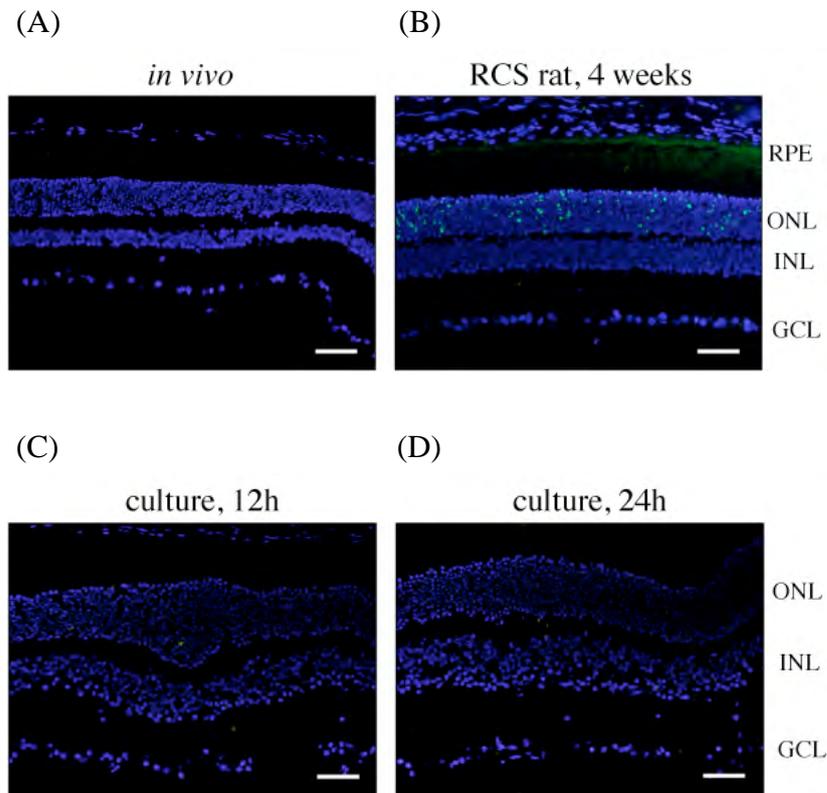


図9. 眼球培養後の網膜におけるアポトーシス細胞検出。

野生型マウスの眼球を 50% DMEM, 25% FBS, 25% HBSS の培地で 12 時間および 24 時間培養したのち、凍結切片を作製し TUNEL 染色をおこなった。ポジティブコントロールには 4 週齢の RCS ラットを使用した。TUNEL 陽性細胞は緑色で、核は DAPI で染色し青色で示した。RCS ラットでは ONL において多数の TUNEL 陽性細胞を認めた (B)。培養前の野生型マウスの網膜では TUNEL 陽性細胞は観察されず (A)、培養 12 時間後 (C) および 24 時間後 (D) でも TUNEL 陽性細胞はほとんど観察されなかった。染色した網膜切片は蛍光顕微鏡を用い 200 倍で観察した。RPE; 網膜色素上皮細胞, ONL; 外顆粒層, INL; 内顆粒層, GCL; ガングリオン細胞層。スケールバーは 100 μm 。

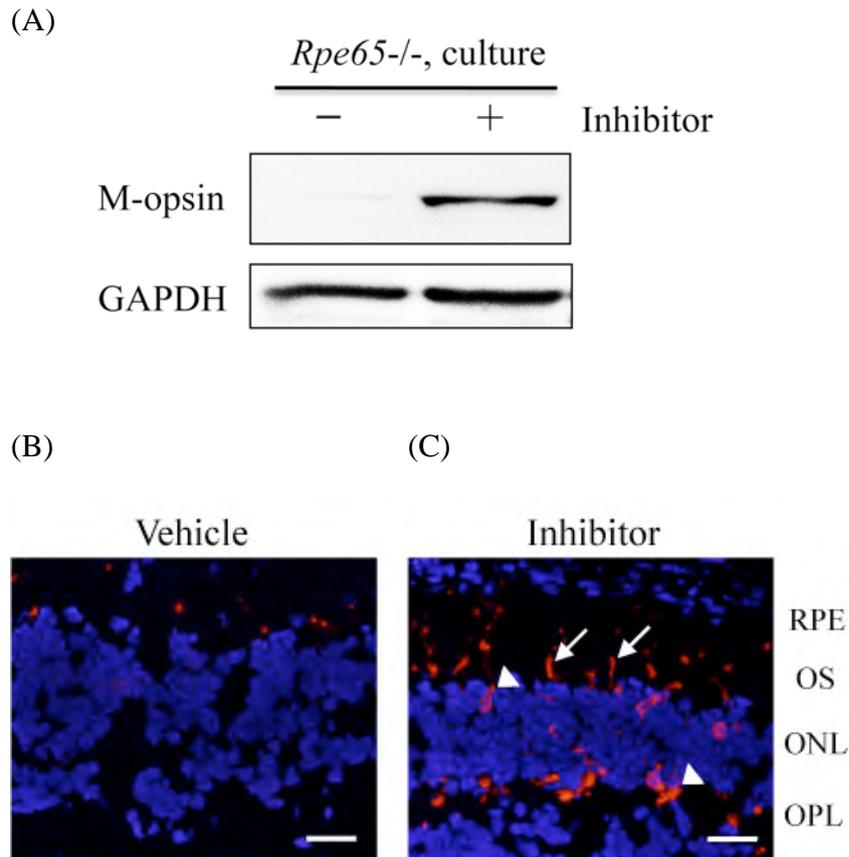


図 10. 培養 *Rpe65*^{-/-}マウス網膜の M-opsin に対するリソソーム/プロテアソーム阻害剤の影響。

3 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を三種類のリソソーム/プロテアソーム阻害剤 (20 μM pepstatin A, 30 μM E64d, 10 μM MG-132) を含む 50% DMEM, 25% FBS, 25% HBSS の培地で 24 時間培養したのち、網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜を回収しウェスタンブロッティングにより、凍結切片を作製し免疫染色により M-opsin を検出した。Vehicle は終濃度 2% DMSO。リソソーム/プロテアソーム阻害剤を加えた眼球ではコントロールに比べ M-opsin タンパク量が多く、分解が抑制されていた (A)。免疫染色では M-opsin を赤色で、細胞核を青色で示した。リソソーム/プロテアソーム阻害剤処理をした網膜は錐体外節 (矢印) のほか、視細胞核周囲やシナプス層 (矢頭) に M-opsin の局在を認めた (B, C)。染色した網膜切片は蛍光顕微鏡を用い 200 倍で観察した。RPE; 網膜色素上皮細胞, OS; 視細胞外節, ONL; 外顆粒層, OPL; 外網状層。スケールバーは 50 μm。

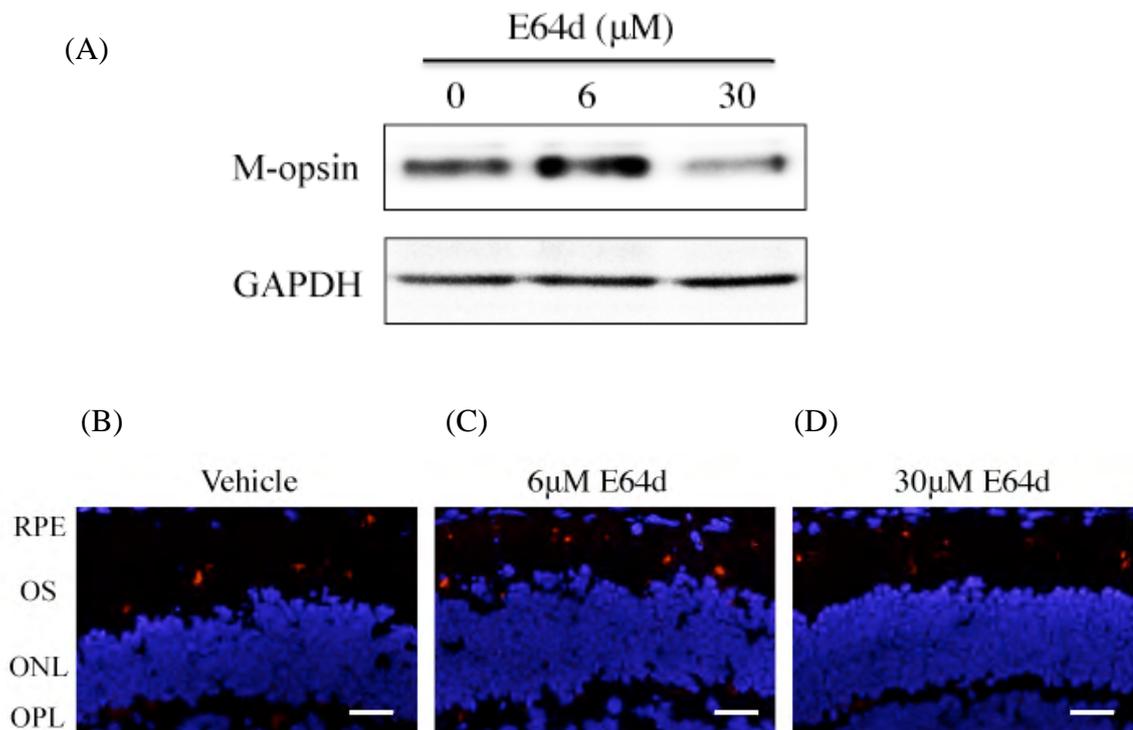


図 1 1. 培養 *Rpe65*^{-/-}マウス網膜の M-opsin に対するリソソーム阻害剤 E64d の影響。

3 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を 6 μM および 30 μM E64d を含む 50% DMEM, 25% FBS, 25% HBSS の培地で 24 時間培養したのち、網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜を回収しウェスタンブロッティングにより、凍結切片を作製し免疫染色により M-opsin を検出した。Vehicle は終濃度 0.2% DMSO。6 μM E64d 処理ではわずかに M-opsin の発現量が増加していたが、30 μM E64d 処理では M-opsin の発現量は減少していた (A)。免疫染色では M-opsin を赤色で、細胞核を DAPI で染色し青色で示した。6 μM および 30 μM E64d 処理をしてもコントロール (vehicle) と比べて局在や染色性の顕著な違いは認められなかった (B-D)。RPE; 網膜色素上皮細胞, OS; 視細胞外節, ONL; 外顆粒層, OPL; 外網状層。スケールバーは 50 μm。

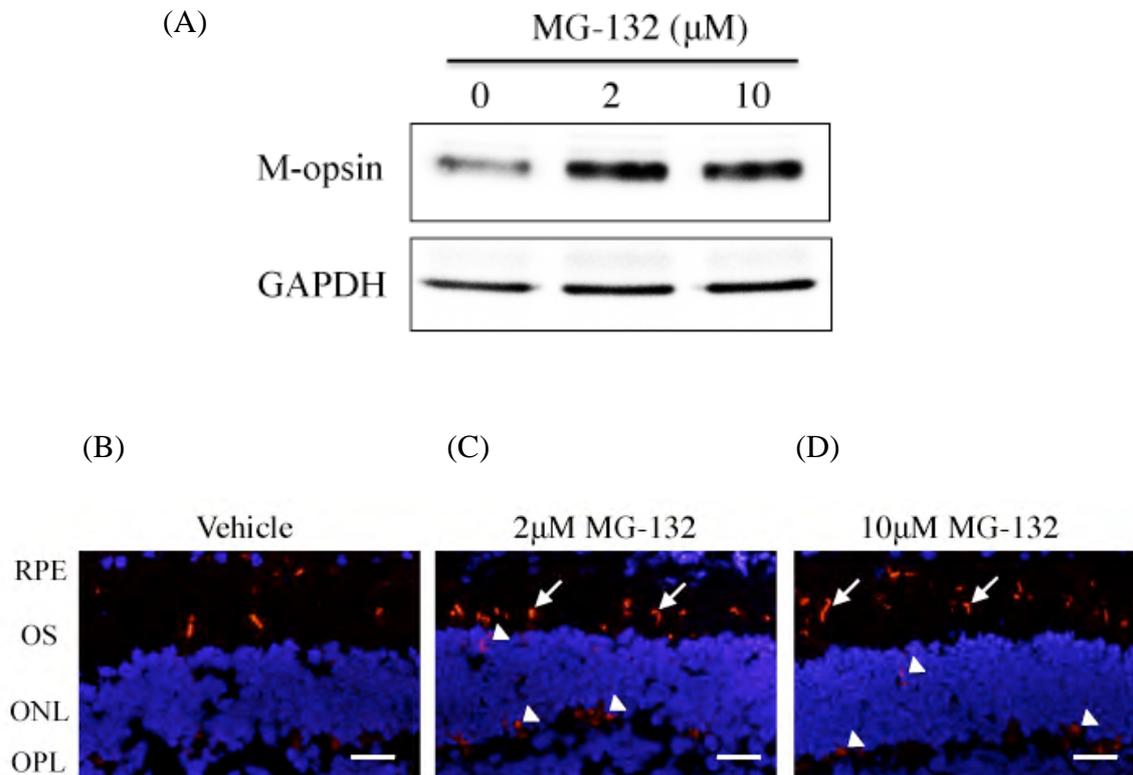


図 1 2. 培養 *Rpe65*^{-/-}マウス網膜の M-opsin に対するプロテアソーム阻害剤 MG-132 の影響。

3 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を 2 μM および 10 μM MG-132 を含む 50% DMEM, 25% FBS, 25% HBSS の培地で 24 時間培養したのち、網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜を回収しウェスタンブロッティングにより、凍結切片を作製し免疫染色により M-opsin を検出した。Vehicle は終濃度 0.02% DMSO。免疫染色では M-opsin を赤色で、細胞核を DAPI で染色し青色で示した。2 μM および 10 μM MG-132 処理により M-opsin の発現量は増加しており (A)、免疫染色による観察では 2 μM および 10 μM MG-132 処理をした網膜においてコントロール(vehicle) に比べて M-opsin 陽性反応が多く観察された (B-D)。MG-132 処理をした網膜は錐体細胞外節 (矢印) のほか、視細胞核周囲やシナプス層 (矢頭) に、コントロールに比べ多くの細胞に M-opsin の局在を認めた (C, D)。RPE; 網膜色素上皮細胞, OS; 視細胞外節, ONL; 外顆粒層, OPL; 外網状層。スケールバーは 50 μm 。

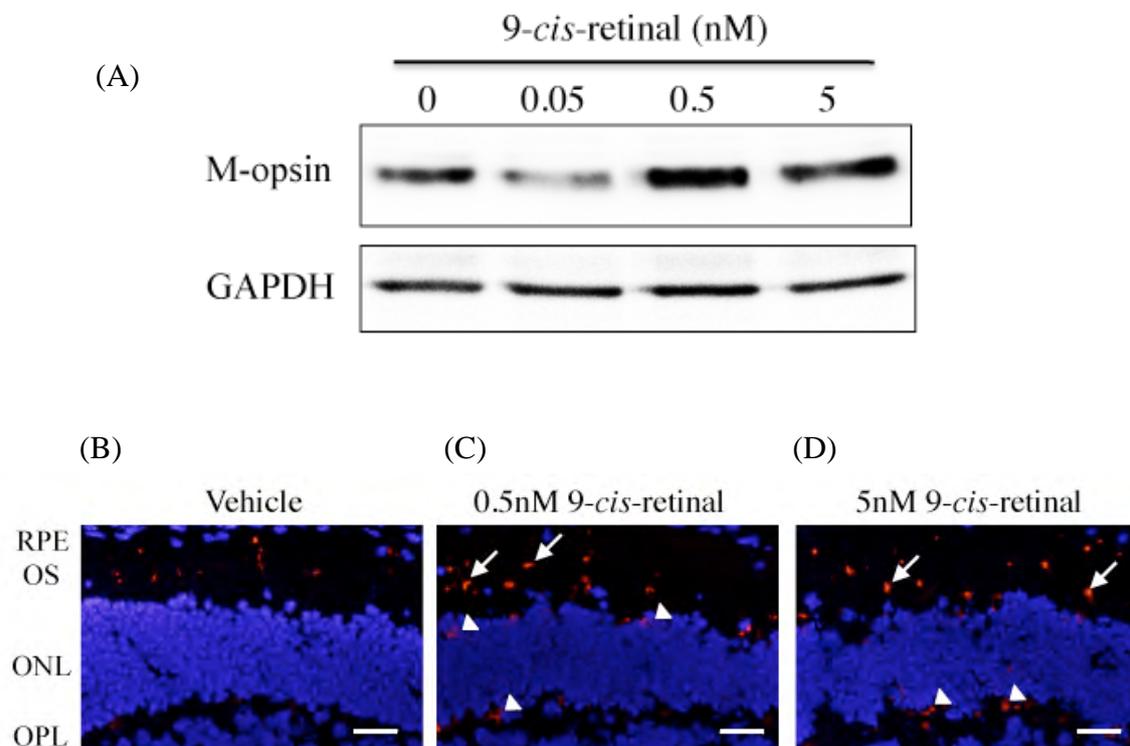


図 13. 培養 *Rpe65*^{-/-}マウス網膜の M-opsin に対する 9-*cis*-retinal の影響。

3 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を 0.05 nM, 0.5 nM および 5 nM 9-*cis*-retinal を含む 50% DMEM, 25% FBS, 25% HBSS の培地で 24 時間培養したのち、網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜を回収しウェスタンブロッティングにより、凍結切片を作製し免疫染色により M-opsin を検出した。Vehicle は終濃度 0.1% エタノール。免疫染色では M-opsin を赤色で、細胞核を DAPI で染色し青色で示した。0.5 nM および 5 nM 9-*cis*-retinal 処理により M-opsin の発現量は増加しており (A)、免疫染色による観察では 0.5 nM および 5 nM 9-*cis*-retinal 処理をした網膜においてコントロール (vehicle) に比べ M-opsin 陽性反応が多く観察された (B-D)。9-*cis*-retinal 処理をした網膜は錐体細胞外節 (矢印) のほか、視細胞核周囲やシナプス層 (矢頭) に、コントロールに比べ多くの細胞に M-opsin の局在を認めた (C, D)。RPE; 網膜色素上皮細胞, OS; 視細胞外節, ONL; 外顆粒層, OPL; 外網状層。スケールバーは 50 μ m。

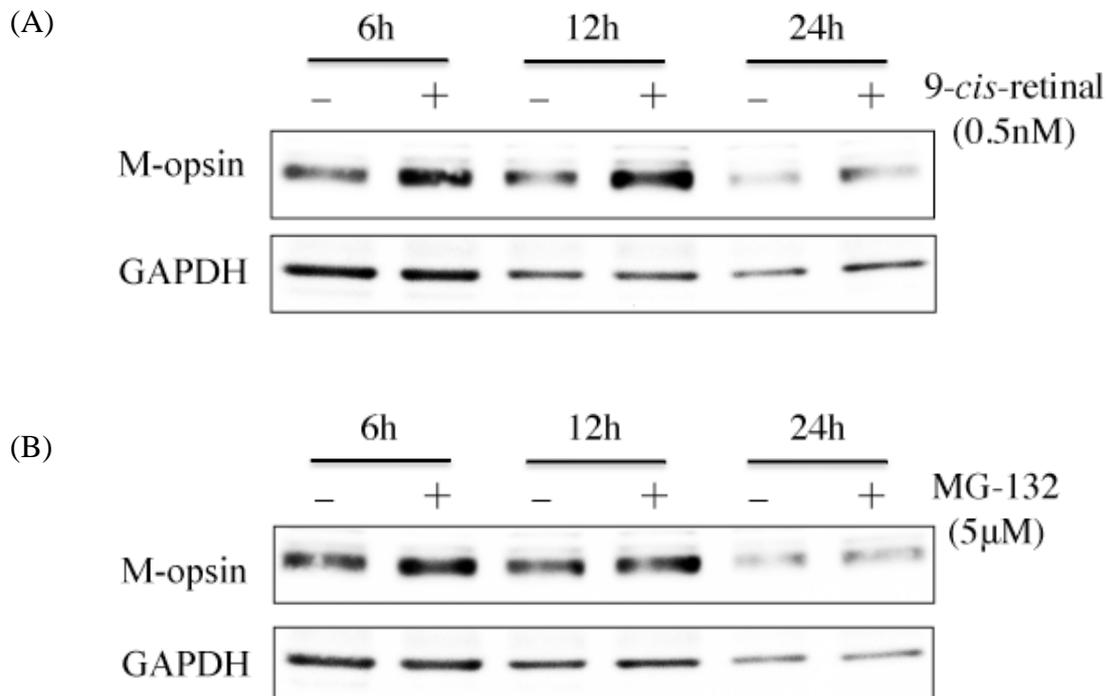


図 1 4 . 培養 *Rpe65*^{-/-}マウス網膜の M-opsin に対する 9-*cis*-retinal および MG-132 の影響。

3 週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスの眼球を 0.5 nM 9-*cis*-retinal および 5 µM MG-132 を含む 50% DMEM, 25% FBS, 25% HBSS の培地で 6 時間、12 時間および 24 時間培養したのち、網膜-網膜色素上皮細胞-脈絡膜を回収しウェスタンブロッティングにより M-opsin を検出した。0.5 nM 9-*cis*-retinal 処理により M-opsin の発現量はコントロールに比べて増加しており (A)、5 µM MG-132 処理においても若干 M-opsin の発現量は増加していた (B)。Loading control として GAPDH を検出したが、培養時間が長くなるにつれて GAPDH の発現量は減少していた (A, B)。

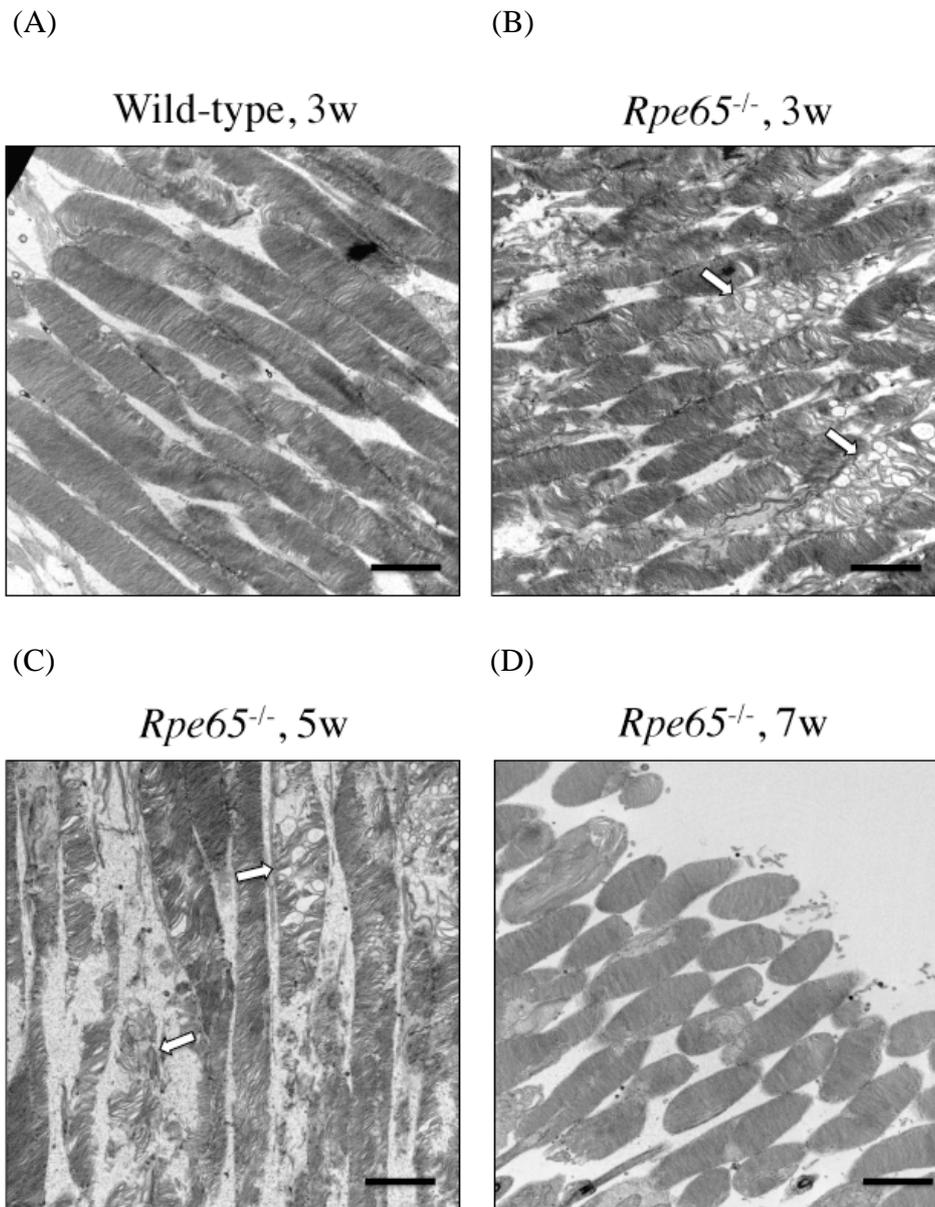


図 15. *Rpe65*^{-/-}マウス網膜の微細形態観察。

3週齢の野生型マウスと3, 5および7週齢の*Rpe65*^{-/-}マウス網膜の視細胞外節部を電子顕微鏡により観察した。3および5週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスでは外節の密度が低く、崩壊している様子が観察された (B, C、矢印)。7週齢の*Rpe65*^{-/-}マウスでは崩壊した外節はほとんど観察されなかったが、外節長が短くなっていた。スケールバーは2 μm。

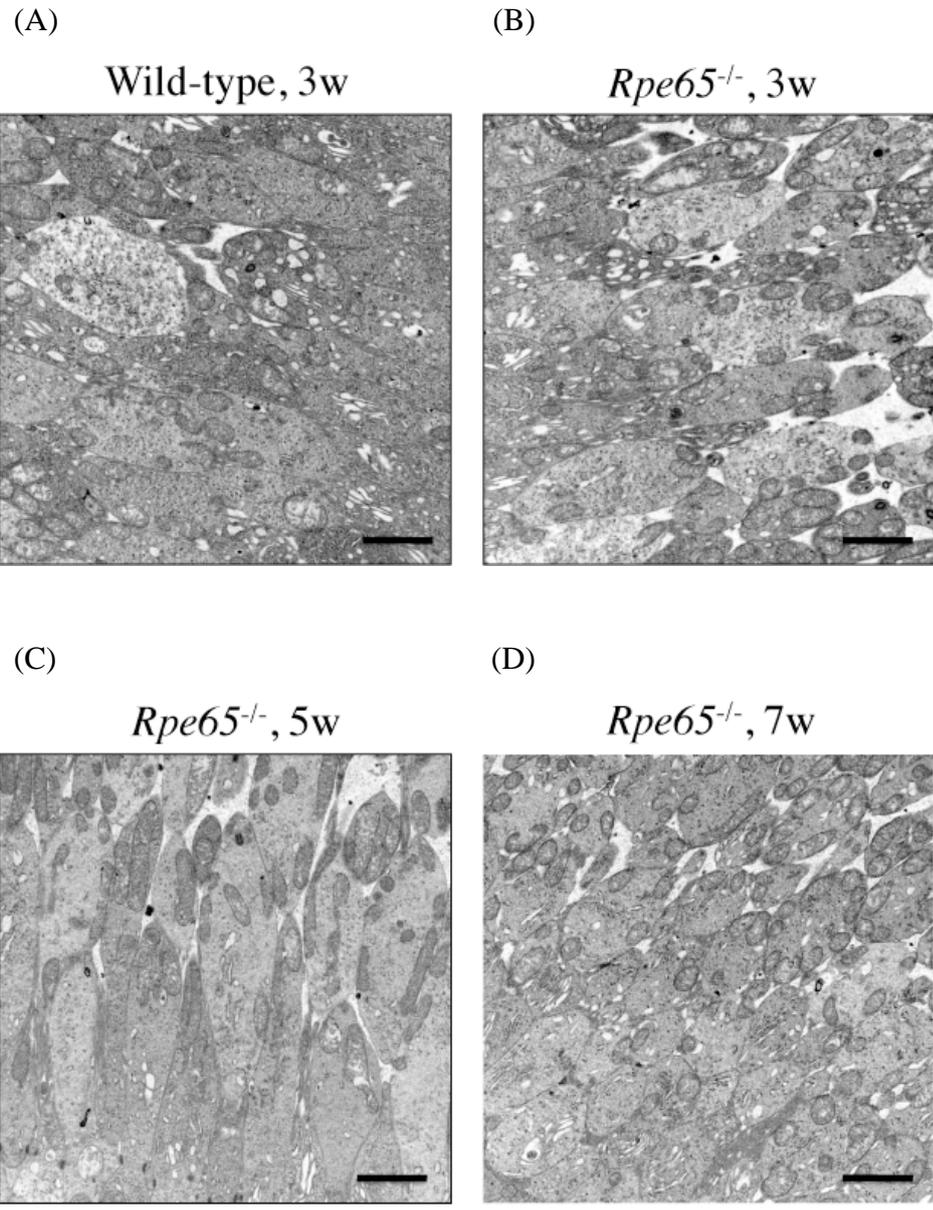


図 16. *Rpe65*^{-/-}マウス網膜の微細形態観察。

3週齢の野生型マウスと3, 5および7週齢の*Rpe65*^{-/-}マウス網膜の視細胞内節部を電子顕微鏡により観察した。*Rpe65*^{-/-}マウスの内節構造は野生型マウスと比較しても顕著な異常を認めなかった。スケールバーは2 μm。

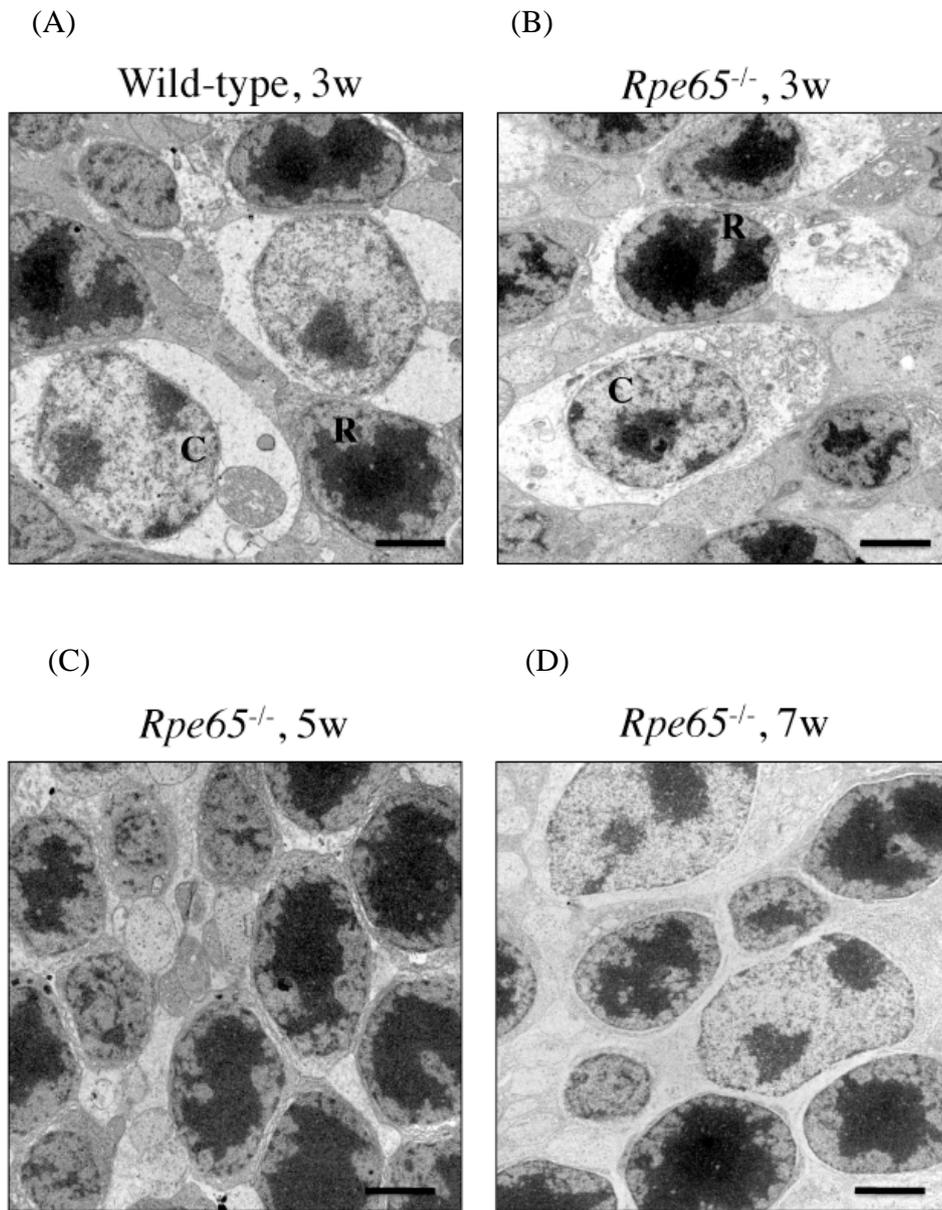


図 17. *Rpe65*^{-/-}マウス網膜の微細形態観察。

3週齢の野生型マウスと3, 5および7週齢の *Rpe65*^{-/-}マウス網膜の視細胞核を電子顕微鏡により観察した。いずれの週齢の *Rpe65*^{-/-}マウスにおいても、細胞死の様相を呈する細胞核は観察されなかった。C; 錐体細胞, R; 桿体細胞。スケールバーは 2 μm 。

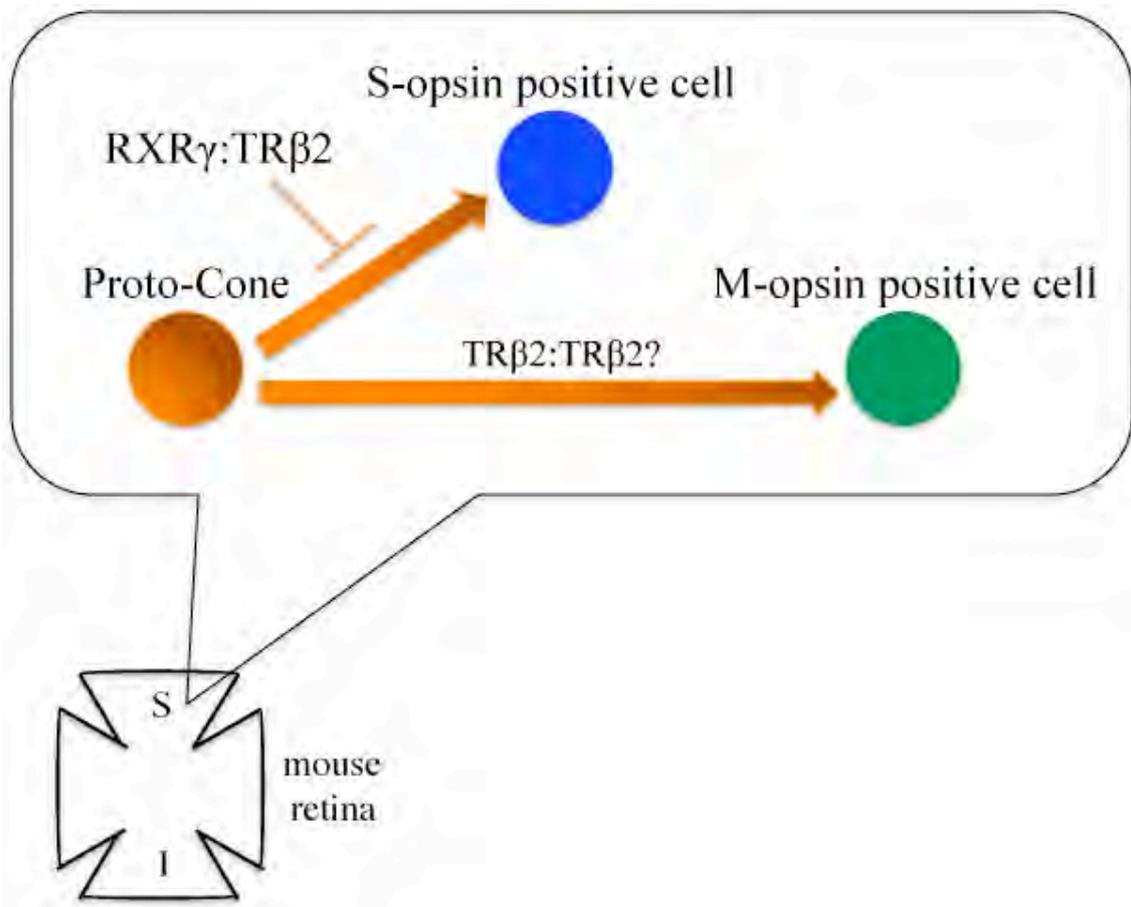


図 18. マウスにおける S-opsin および M-opsin の発現制御(文献 46 より改変)。

マウス網膜上方において、RXR γ と TR β 2 のヘテロダイマーからのシグナルにより、S-opsin の転写は抑制される⁷⁶。また、M-opsin の転写には TR β 2 のホモダイマーからのシグナルが必要であると推測されている⁸⁰。*Rpe65*^{-/-}マウスの網膜上方において S-opsin 陽性細胞数が野生型に比べ増加していた原因として、RPE65 の欠損により未知の内在性リガンドが減少し、RXR γ と TR β 2 のヘテロダイマーからのシグナルが弱まったために、S-opsin の転写抑制が不十分であった可能性が考えられる。S; 網膜上方, I; 網膜下方。

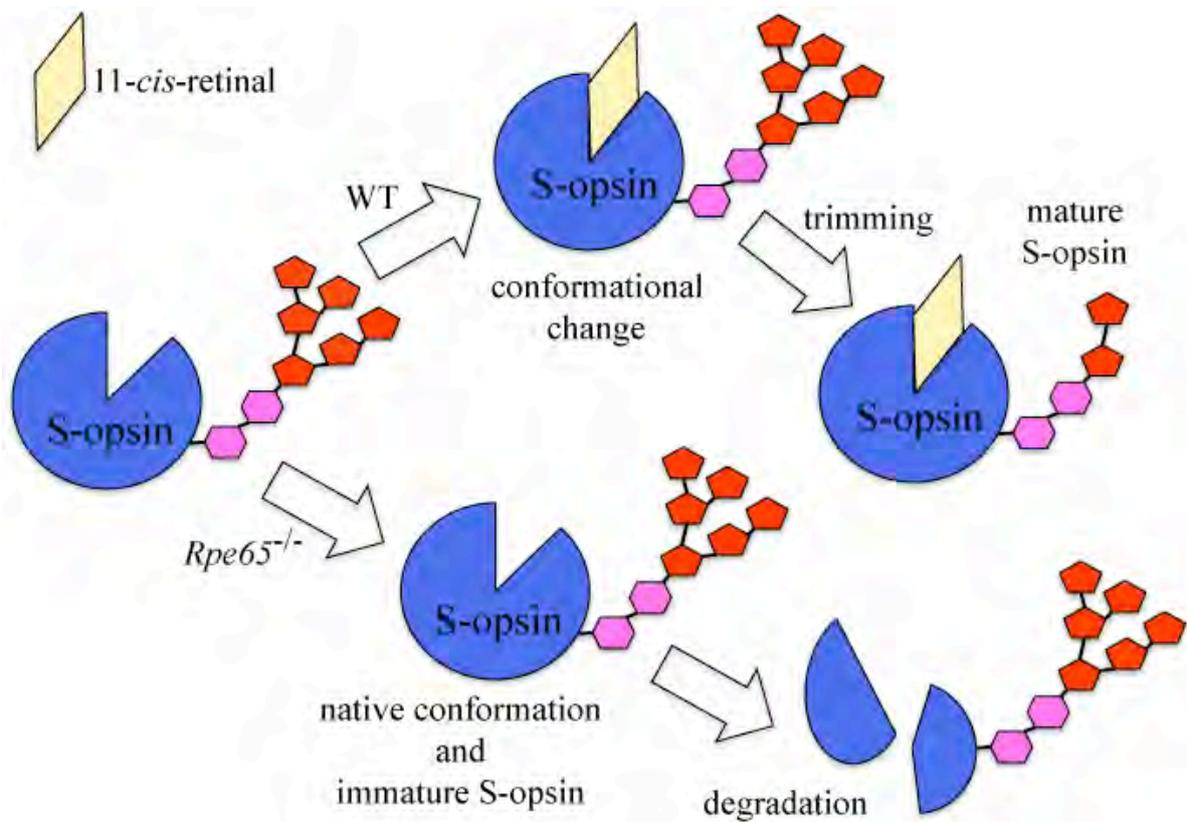


図 19. マウスにおける S-opsin タンパク質の翻訳後調節と 11-*cis*-retinal の役割。

マウスの S-opsin タンパク質は 11-*cis*-retinal が結合することによりおそらく立体構造の変化を生じ、糖鎖切断が正常におこなわれ外節へ輸送される。*Rpe65*^{-/-} マウスでは 11-*cis*-retinal が結合しないことで糖鎖切断に必要な立体構造の変化が起こらず、糖鎖切断が不完全な状態となる。また、*Rpe65*^{-/-} マウスでは S-opsin の輸送障害が生じ、視細胞核周辺やシナプス層に局在してしまう。加えて、糖鎖切断が不完全な未成熟 S-opsin タンパク質の一部は、比較的大きい断片に分解される。

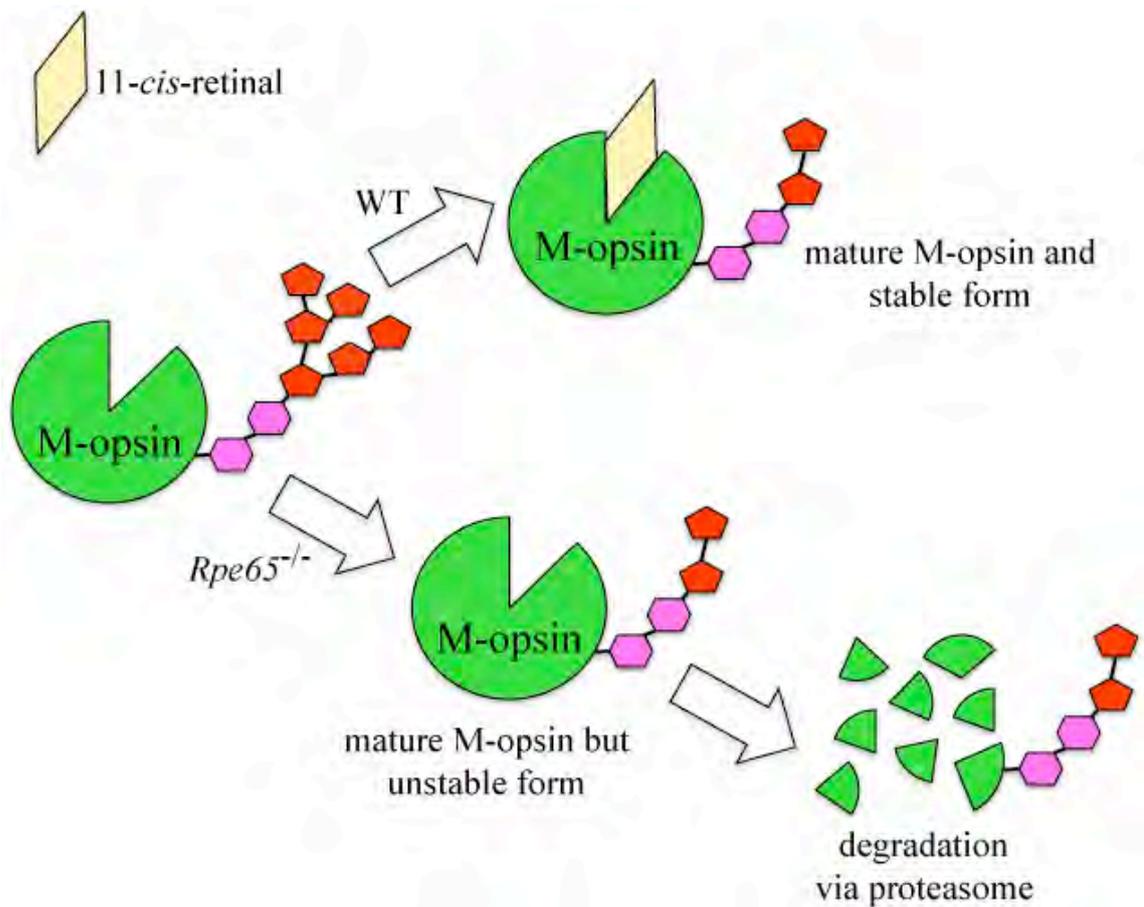


図 20. マウスにおける M-opsin タンパク質の翻訳後調節と 11-*cis*-retinal の役割。

マウスの M-opsin タンパク質は 11-*cis*-retinal が結合することによりおそらく立体構造の変化を生じた結果、安定な構造となる。*Rpe65*^{-/-}マウスでは M-opsin の mRNA が発現し M-opsin タンパク質も翻訳されるが、11-*cis*-retinal が結合しないために不安定な構造となり、急速に分解される。また、その分解経路には少なくともプロテアソーム系が関与している。M-opsin タンパク質成熟には 11-*cis*-retinal は関与しておらず、11-*cis*-retinal の有無に関わらず糖鎖切断は正常におこなわれる。

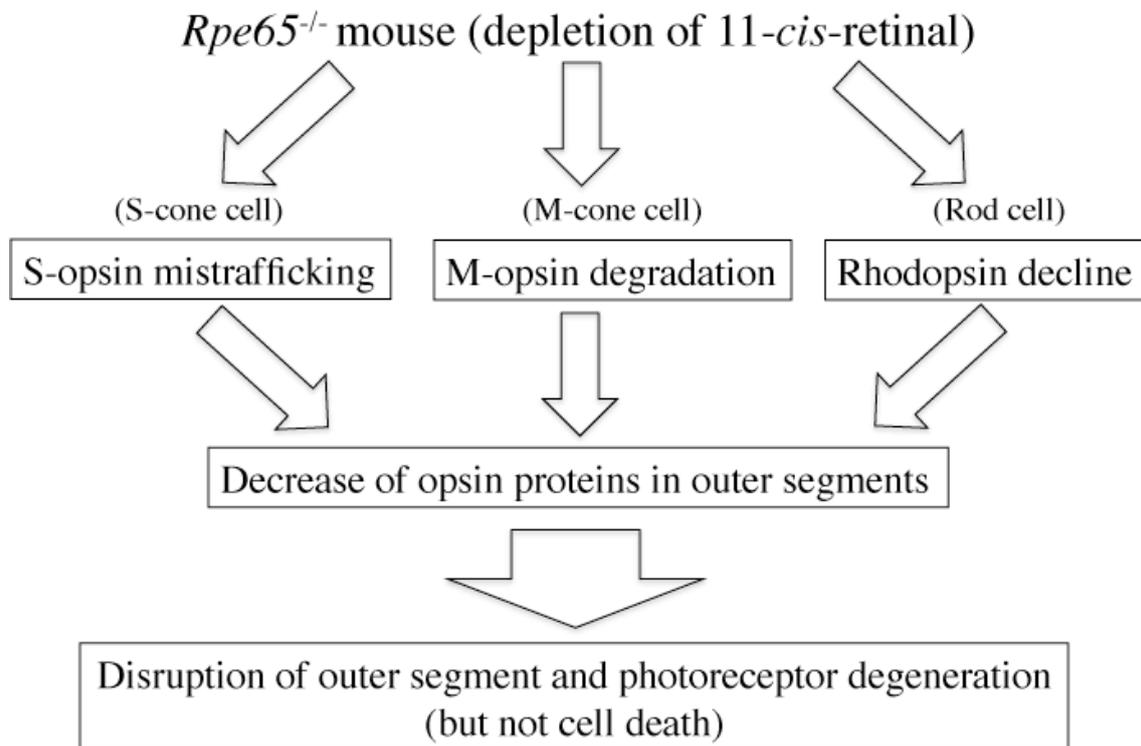


図 2 1. *Rpe65*^{-/-}マウスの視細胞外節の崩壊機序

Rpe65^{-/-}マウスの網膜内で 11-*cis*-retinal が枯渇することにより、錐体オプシンは翻訳後に局在異常や分解が生じる。またロドプシンの mRNA 発現低下によるタンパク質の減少が生じ、視細胞外節を構成する錐体オプシンおよびロドプシンが外節内で不足する。その結果、外節内の円盤状構造の密度が下がり外節構造の崩壊が起きる。しかしながら視細胞内節や細胞核に大きな影響はなく、細胞は生存している。*Rpe65*^{-/-}マウスは若齢で視細胞外節が崩壊する一方、成体でも視細胞死はほとんど生じないという特徴をもつ。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜りました弘前大学農学生命科学部分子生命科学科 石黒 誠一 教授、同 菊池 英明 教授、同 片方 陽太郎 教授、岩手大学農学部動物科学課程 高橋 壽太郎 教授に深く感謝申し上げます。

本実験を遂行するにあたり、全面的なご協力をいただきました弘前大学大学院医学研究科眼科学教室 中澤 満 教授に深謝いたします。電子顕微鏡観察にご協力いただいた弘前大学医学部臨床中央研究室 宮本 茂 技官に深く感謝申し上げます。