

桿体視細胞における all-trans レチナールで誘発される光毒性

○中谷 敬¹, Yiannis Koutalos², Rosalie K. Crouch², 増富康亮¹
(¹ 筑波大学大学院生命環境科学研究科・² Medical University of South Carolina)
Key words: retinal rod, all-trans retinal, phototoxicity

目的

All-trans レチナールは視物質の再生に関わる視覚サイクル (visual cycle) における重要な中間産物である。ロドプシンが光を吸収するとレチナールは 11-cis から all-trans に異性化される。続いて all-trans レチナールはオプシンから離れ、レチノール脱水素酵素によって all-trans レチノールに還元される。All-trans レチノールは桿体外節から網膜色素上皮へと運ばれ、そこで 11-cis レチナールへと再生されたあと再び外節に戻されてロドプシンが再生される。

All-trans レチナールのクリアランス異常が、加齢黄斑変性症、シュタルガルト病、黄色斑眼底、そして劣性遺伝性網膜色素変性症を含むさまざまな網膜の疾患に関係することが示唆されている。All-trans レチナールの細胞毒性の原因として、光感受性物質としてのはたらき (Delmelle, 1978; Krasnovsky et al., 1979)、網膜色素上皮のリポフツシンの有害成分である A₂E の生成 (Liu et al., 2000) など、いくつかの可能性が提唱されている。All-trans レチナールの吸収極大は約 380nm なので、その吸収域は可視光にまで広がっている。視細胞外節は多価不飽和脂肪酸が多いので、特に酸化ダメージを受けやすい (Fliesler and Anderson, 1983)。したがって、all-trans レチナールが、視細胞外節で光によって引き起こされる障害の原因となり、網膜の疾患の発生に重要な役割を果たしている可能性が高い。

今回は、視物質による光検出の副産物として必ず生じる、生理的に産生された all-trans レチナールの光毒性を明らかにする目的で実験をおこなった。

方法

材料には、カエル (*Rana pipiens*) あるいはマウスの網膜から単離した桿体視細胞を用いた。脂質の酸化の観察は、蛍光プローブ BODIPY C-11 を用い、細胞イメージング法により行った。単離した細胞は 10 mM BODIPY C-11 中で 30 分間インキュベートした後、Ringer 液で洗浄することによって余分な色素を除去した。レチノールの蛍光は 360 nm の光で励起し、蛍光イメージ (発光 >420 nm) は Hamamatsu C4742 CCD カメラを用いて取り込んだ。インタクトな BODIPY C-11 の蛍光は 555 nm で励起し、617nm で記録した。また、酸化した BODIPY C-11 の蛍光は 490 nm で励起し、528 nm で記録した。

桿体外節膜はウシの網膜から精製した。光酸化は 360 nm の UV 光で誘発した脂質の過酸化として測定した。脂質の過酸化の測定は、精製外節膜を用いたチオバルビツール酸アッセイによる方法、および BODIPY C-11 を用いた方法で行った。BODIPY C-11 の酸化は、この色素のインタクトな型と酸化した型から生じる蛍光シグナルの比を測定することによって求めた。

結果

あらかじめ退色させた桿体外節膜に外から all-trans レチナールを加えると光酸化が増大した。暗順応させた桿体外節

膜では、ロドプシンの退色から 1 時間後に光酸化が最大になった。暗順応した桿体外節膜では、光酸化は退色後 1 時間で最大となった。単離した視細胞では、代謝機能が損なわれた外節のみの標本で、ロドプシンの退色から 1 時間後に光酸化が最大となった。外節と内節を持ったインタクトな桿体視細胞では、光酸化は起こりにくかった。これは、代謝機能が損なわれた桿体外節では、レチノール脱水素による all-trans レチナールからレチノールへの効率的な変換ができなためであると考えられる。

考察

以上の結果から、退色したロドプシンから放出された all-trans レチナールは、精製した外節膜と生きた単離桿体視細胞の両方で、光誘発性の脂質過酸化を引き起こすことが明らかになった。また、レチノール脱水素の作用でレチノールへと変換されることによって all-trans レチナールが減少することで、光によって誘発される細胞の変性を防ぐことができる。

引用文献

- Delmelle M. Retinal sensitized photodynamic damage to liposomes. *Photochem Photobiol* 28:357-60. 1978.
Fliesler SJ, Anderson RE. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog Lipid Res* 22:79-131. 1983.
Krasnovsky AA, Jr., Kagan VE. Photosensitization and quenching of singlet oxygen by pigments and lipids of photoreceptor cells of the retina. *FEBS Lett* 108:152-4. 1979.
Liu J, Itagaki Y, Ben-Shabat S, Nakanishi K, Sparrow JR. The biosynthesis of A₂E, a fluorophore of aging retina, involves the formation of the precursor, A₂-PE, in the photoreceptor outer segment membrane. *J Biol Chem* 275:29354-60. 2000.

BODIPY C-11 の酸化による蛍光スペクトルのシフト

