



# Photoreceptor sensitivity as a function of rhodopsin content in the isolated bullfrog retina

鳥羽, 幸雄

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1985-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0570

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000570>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) と ば ゆき お 雄 (大阪府)  
 学位の種類 医 学 博 士  
 学位記番号 医博い第473号  
 学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当  
 学位授与の日付 昭和60年3月31日  
 学位論文題目 Photoreceptor Sensitivity as a Function of  
 Rhodopsin Content in the Isolated Bullfrog  
 Retina  
 (剥離ウシガエル網膜におけるロドプシン量と視細胞感度  
 との関係)

審 査 委 員 主査 教授 埴 功  
 教授 松 本 悟 教授 山 本 節

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒 言

明順応に伴う視細胞感度の低下は、視細胞中の腿色した視物質とその中間物質の量に関係している。視細胞感度と視細胞中に含まれるロドプシン含有量との関係は、アスパラギン酸処理した剥離網膜より得られたPⅢ応答を指標として以前より調べられていた。しかし、PⅢ応答にはMüller細胞由来の slowPⅢ応答が含まれており、視細胞感度の正確な指標としては、この slowPⅢ応答を除き fastPⅢ応答を分離することが必要である。近年  $Ba^{2+}$  が slowPⅢ応答を選択的に抑制することが報告され、さらにこの効果は  $Ba^{2+}$  がMüller細胞の細胞膜の  $K^+$ コンダクタンスを減少させる作用によるものであることが示された。

そこで著者は、ウシガエルの剥離網膜にアスパラギン酸と $Ba^{2+}$ を加えることにより、fastPⅢ応答を分離し、一定の振幅を持った fastPⅢ応答を発生させるのに要する刺激光強度(閾値)の対数の逆数を視細胞感度とし、ロドプシン含有量を減少させたときの感度変化につき検討した。さらに、視細胞内の情報伝達物質として注目されている $Ca^{2+}$ とcyclic GMPの働きを、前者については浸漬液の $Ca^{2+}$ 濃度を変化させること、後者についてはcyclic GMPの分解酵素であるphosphodiesteraseの阻害剤であるパパベリン、isobutyl methylxanthine (IBMX)を作用させることにより

検討を加えた。

## 方 法

暗順応したウシガエルの眼球を摘出し、強膜を取り去り、濾紙上で眼球を角膜側を上にして赤道部で折半した。さらに網膜上に小孔をあけた濾紙を軽く乗せた後、慎重に分離させた。この操作により感覚網膜のみを小孔のあいた濾紙に付着させることが出来る。次いでこの網膜を2つのアクリル製の小函間に装着し、網膜の両側を浸漬液(modified Conway液)に浸し、両側より寒天橋、甘汞電極を介して網膜の電気応答を記録した。さらにこれらの装置を分光光度計の試料室内に入れ、網膜の分光吸光度を測定し、ロドプシン含有量を同時に記録した。

刺激光は500Wキセノンランプよりファイバースコープを通し、熱線吸収フィルター、干渉フィルター(430, 500, 580nmの3種)、適当な値のNDフィルターを介して網膜に照射した。照射時間は0.1秒とした。20  $\mu$  Vの fastP III 応答を発生させる刺激光の強さを閾値とし、その時に用いたNDフィルターの値を網膜の感度として表わした。さらに500Wキセノンランプより490nmに最大透過率を有するフィルターを通した光を過剰な時間照射し、ロドプシン量を減少させて、同様に感度の測定を行なった。

浸漬液はConway 液に5 mMアスパラギン酸と0.5mM  $\text{Ba}^{2+}$ を加えた液を用いた。低 $\text{Ca}^{2+}$ 液としては $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を1.0mMから0.01mMに減少させた液を用いた。パパベリン、IBMXは各々0.1mM, 15  $\mu$  Mを浸漬液に加えた。浸漬液には98%  $\text{O}_2$ , 2%  $\text{CO}_2$ ガスを通気して pHを7.8に保った。

## 結果および考按

### (1) 正常液におけるロドプシン含有量と fastP III 応答閾値との関係

ロドプシン含有量の減少とともに fastP III 応答の閾値の上昇がみられた。この変化はS字状の関係を示し、Michaelis-Menten の式で近似することができた。このことは、従来調べられたERGb波とロドプシン含有量との関係が直線状の関係を示すこととは異なっていた。

また500nmの刺激光が他の波長に比べ最も閾値が低かったが、ロドプシン含有量の変化に対する相対閾値の変化は刺激光の各波長間で変化はなかった。即ちカエル網膜に含まれる数種類の視細胞のうち、この応答に関係しているのは、ロドプシンが含まれている赤色桿状体のみであることが判明した。

### (2) 低 $\text{Ca}^{2+}$ の影響

低 $\text{Ca}^{2+}$ 状態では fastP III 応答は振幅が約2倍に増大したが、ロドプシン含有量の変化に対する相対閾値の低下は、やはりS字状の関係を示した。しかし、その変化は、一定のロドプシン含有量の減少に対して正常液の場合に比べ、より大きく閾値が低下する方向に変移した。

### (3) IBMX およびパパベリンの影響

15  $\mu$  M IBMX,あるいは0.1mMパパベリンを浸漬液に加えると、いずれも fastP III 応答の時間経過の延長が認められた。ロドプシン含有量の変化に対する相対閾値の変化は、IBMXの場合では正常液の結果とほぼ同様か、あるいはむしろ閾値低下の少ない方向に変移するのに対し、パパベ

リンの場合には低  $\text{Ca}^{2+}$  の場合と同様に閾値低下が大きくなる方向に変移した。これらの結果から  $\text{Ca}^{2+}$  濃度低下およびパパベリンによる作用はIBMXとは異なり、細胞内情報伝達質量に対する直接の影響ではなく、桿状外節中の円板膜構造を変化させ、円板からの伝達物質放出量を減少させるものと考えられた。

## 結 語

(1) ウシガエル剥離網膜にアスパラギン酸と  $\text{Ba}^{2+}$  を作用させることにより fastPⅢ 応答を選択的に記録し、ロドプシン含有量の変化に対する相対閾値の変化を調べた。

(2) fastPⅢ 応答の相対閾値はロドプシン量の減少とともに低下し、その関係はS字状を示し、これはMichaelis-Menten の式で近似することができた。

(3) 刺激光の波長による相対閾値の変化の差は認められず、赤色桿状体中に存在するロドプシンのみがこの反応に主に関係していることが判明した。

(4) 低  $\text{Ca}^{2+}$  および IBMX, パパベリンにより、ロドプシン含有量の変化に対する相対閾値の変動に差異がみられたが、低  $\text{Ca}^{2+}$  およびパパベリンでは細胞内情報伝達質量に直接影響を与えるのではなく、桿状外節中の円板膜構造に影響を与えるものと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

視細胞の光感受性は視細胞内に含まれる視物質および視物質の光分解中間産物量によって定まる。桿状体に含まれるロドプシン量と視細胞の光感受性との関係については、従来からアスパラギン酸を作用させた脊椎動物の剥離網膜を用いて研究が進められて来た。しかし、アスパラギン酸のみを作用させた網膜では視細胞の光応答にMüller細胞からの応答が混在するために、視細胞のみの光感受性を正確に測定することが困難であった。最近、網膜にBaイオンを作用させるとMüller細胞からの応答が消失することが判明したので、申請者はカエル剥離網膜にアスパラギン酸とBaイオンを同時に作用させてERGから視細胞電位のみを分離し、視細胞電位発生の閾値とロドプシン含有量との関係をしらべるとともに、視細胞の細胞内伝達物質として重要視されているCaイオンおよびCyclic GMP phosphodiesterase の働きについても検討を加えた。

実験には暗順応したウシガエルの剥離網膜を特製の小函間に挿み、網膜の両側をアスパラギン酸およびBaイオンを含む浸漬液に浸して網膜の両側から光刺激に伴う視細胞電位 (fastPⅢ 応答) を誘導記録するとともに、上記の装置を分光光度計の試料室に静置し、500nm光による網膜の吸光度を測定して同一網膜内のロドプシン量を求めた。視細胞の光感受性は閾値として20  $\mu\text{V}$  の光応答を発生させるに要する500nm光の強さの対数で表わし、一方、ロドプシン含有量は暗順応網膜値を1.0として相対値で表わした。視物質の部分退色にはキセノン光源から光路に490nmに最大透過率を有するフィルターを透過した光 (チアン色) を網膜に照射した。

正常浸漬液に浸した網膜では fastPⅢ応答とロドプシン含有量との関係は次式によって示されることが判明した。

すなわち

$$R = \frac{(I_0/I)^n}{(I_0/I)^n + \delta^n} \dots\dots\dots (1)$$

ここで、 $I_0$ は暗順応時の閾値、 $I$ は部分退色の各段階での閾値、 $R$ はロドプシン含有量の相対値、 $\delta$ はロドプシン含有量が0.5になった時の $I_0/I$ 値である。実験結果から  $n$ は1.55、 $\delta$ は-1.33となり、これらの値は刺激光の波長を500nmから430nmあるいは580nmに変えても変化が認められなかった。このことはカエル網膜には視細胞として赤色杆状体の他に、緑色杆状体および錐状体も存在するが、以上の視物質の部分退色による閾値変化は主として赤色杆状体の光感受性の変動を示すことが判明した。

正常浸漬内のCaイオン濃度を1.0mMから0.01mMに減少させると、ロドプシン含有量の変化に伴う閾値変化は(1)式の $n$ および $\delta$ の値がそれぞれ0.90および-1.55に変動した。すなわち、Caイオン濃度の低下はロドプシン量減少に伴う閾値上昇が正常浸漬内よりも増大することを示す。

次に、phosphodiesterase の阻害剤である papaverine あるいはIBMXを正常浸漬液内に添加すると、いずれも fastPⅢ応答の時間経過の延長が認められたが、ロドプシン量と閾値との関係をしらべると、papaverine ではCaイオン減少時と同様な変化が認められたのに反して、IBMXでは正常浸漬液内と比べて著明な変化が認められなかった。

以上の実験結果から視物質量と視細胞電位の閾値との関係は(1)式を用いて示されるとともに、細胞外液のCaイオン濃度の低下および papaverine の添加によって視細胞外節円板膜に高次構造変化がおこることが想定された。

本研究は視細胞における光情報変換機構を研究する上で、基礎的な重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって申請者は医学博士の学位を得る資格があると認める。