

## 145. ドパミンによる網膜視細胞の応答抑制

佐藤 慎哉

国立循環器病研究センター研究所 先進医工学部門 先端医療技術開発部 組織特異的血管病態研究室

Key words : 視細胞, ドパミン, Protein kinase A, 多光子顕微鏡, *ex vivo* ERG

### 緒言

網膜の視細胞には暗い所で光感度を増強する順応の仕組みがある。1990 年台の生化学的、電気生理学的な研究、2000 年台のノックアウトマウスを用いた分析などにより、順応を司るタンパク質として、ロドプシンのリン酸化を調節する s-modulin/recoverin と、環状 GMP の合成効率を調節する GCAPs の 2 種類のカルシウム結合タンパク質が同定、研究された。現在、順応は主に視細胞内のカルシウム濃度が司る仕組みと理解される [1]。しかし、上記 2 種類のタンパク質を欠損するマウスの錐体視細胞で順応が生じることも報告され [2]、順応はカルシウムだけでは完全に説明できないと思われる。

カルシウム以外に光感度調節に関与し得る物質としてドパミンがある。ドパミンは、視細胞のある網膜外層とは逆側、内層にあるドパミン作動性アクリン細胞で合成、放出されるが、興味深いことに昼間に放出が増加する概日リズムを示す [3]。放出されたドパミンはシナプス伝達ではなく、拡散で網膜内の各細胞に到達する [3]。網膜内層のニューロンでは、ドパミンは主に D1R 受容体で認識され、下流で G タンパク質の  $G_{\text{solf}}$  を介した環状 AMP (cAMP) 濃度上昇と、それに伴う様々な神経機能調節や、ギャップ結合調節を介した神経回路の再編成を引き起こす [3]。対照的に視細胞では、ドパミンは D4R 受容体で認識され、下流で  $G_i$  を介した cAMP 濃度低下と、それに伴う細胞形態の変化や、視細胞間のギャップ結合ネットワークの縮小を引き起こす [3]。しかし、ドパミンが視細胞の順応、すなわち光感度調節に及ぼす影響については、文献によって異なる結果が報告されており、まだ知見として確立していない [3]。

私は 2020 年に、網膜の各細胞が示す Protein Kinase A (PKA) 活性をライブイメージングする手法と、光オフで桿体視細胞の PKA が活性化する現象を報告した [4]。この論文では桿体 PKA の活性化機構の一部を明らかにしたが、桿体における PKA の役割を示すことはできなかった。PKA は cAMP 依存的に活性化するキナーゼであり、一方ドパミンは先述の通り、昼間に放出が増加し、視細胞 cAMP 濃度を低下させる。したがって PKA は、網膜ドパミン放出が減少する夜間に活性化して、暗所視感度を増強する役割を持つと予想された。実際に、*in vitro* の酵素活性測定 [5, 6] では、この予想を支持する結果が報告されている。しかし生理学的な知見は、2019 年に PKA の機能を阻害する変異を持つマウス桿体で暗順応の遅延 [7] が報告された程度で、限定的だった。

そこで本研究ではドパミン、PKA、光感度の関係を定量的に示すことで、PKA が桿体の夜間視感度を増強する、という仮説を検証した。より具体的には、ドパミンが視細胞 PKA を抑制することを PKA 活性イメージングで、ドパミンが視細胞の光感度を抑制することを電気生理学的な測定で、それぞれ示した。この研究で、視細胞の順応機構には既知のカルシウム機構だけではなく、ドパミンと、その下流の cAMP-PKA 系による仕組みも存在することを示したい。

### 方法

#### 1. 使用した実験動物

動物実験計画は京都大学の医学研究科動物実験委員会にて審査を受け、承認された (承認番号 MedKyo20081)。マウスは京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設の SPF 領域にて明 14 時間、暗 10 時間の照明条件の下、常に固形餌と水を得られる条件で飼育した。PKAchu マウス (nbio185、医薬基盤健康栄研) は所属研究室で作製され、B6 Albino マ

ウスとの交配で10世代以上継代された後、さらにC57BL/6Jマウスとの交配で5世代以上継代された遺伝子型ヘテロのものを用いた。B6 Albino、およびC57BL/6J (B6J) マウスはチャールス・リバー (現ジャクソン・ラボラトリー) から購入した。*Gnat1*<sup>-/-</sup>マウスはVladimir Kefalov 博士 (Washington University in St. Louis, 現所属 UC Irvine) から頂いた。マウスは実験前に3時間以上暗箱の中で飼育して、十分に暗順応させた状態で用いた。

## 2. 多光子顕微鏡を用いた網膜PKA活性イメージング

詳細は過去の文献に記した [4]。以下の操作は弱い赤色光照明の下で行われた。網膜試料は、PKAchu マウスをイソフルラン麻酔下で頸椎脱臼法により安楽死処理した後、ピンセットと微小ハサミを使って単離され、カルチャーインサート上でフラットマウントにされた。同試料は灌流チャンバーに設置され、DMEM/F12 培地灌流下で多光子顕微鏡を使って、4~5 時間タイムラプス観察された。対物レンズを通過した蛍光はCFP シグナル (460~500 nm) と FRET シグナル (主に YFP 由来、520~560 nm) に分けられた後、検出された。PKA 活性像はこれら2種類のシグナルの比として得た。画像はFIJI (<https://imagej.net/software/fiji/>) で分析された。

## 3. *ex vivo* ERG 法を用いた視細胞フラッシュ光応答の電位測定

詳細は過去の文献に記した [8]。上述の方法で単離した B6J、または *Gnat1*<sup>-/-</sup>マウスの網膜は、アクリル製の *ex vivo* ERG アダプターに乗せた後、照明装置と灌流装置を備えた暗箱に設置された。視細胞の応答成分を測定するために、灌流用の DMEM/F12 培地には視細胞以外の細胞の応答を阻害する物質を添加した。刺激用の 2 ms フラッシュ光は LED 光刺激装置 [4] で生成し、刺激時間と強度はデジタイザーとその付属ソフトウェアを用いて PC を介して制御された。電位応答は差動増幅器で増幅された後 PC に記録された。データは Clampfit (Molecular Devices) で分析された。

# 結果

## 1. ドパミンは桿体視細胞の PKA 活性を強く抑制する

視細胞は抑制性のドパミン受容体 D4R を発現するため、ドパミンによって視細胞 cAMP の減少、および PKA 抑制が生じると予想された。これを確認するために、多光子顕微鏡を用いて PKAchu マウス網膜のタイムラプスイメージングを行い、灌流液にドパミンを添加することで、網膜内の各細胞の PKA 活性がどのような応答を示すのかを観測した。その結果、予想通り視細胞内節・外節層 (PRS) では PKA 抑制が観測された (図 1a, PRS)。また、活性型ドパミン受容体 D1R を持つ内網状層 (IPL) では逆に PKA 活性化が観測された (図 1a, IPL)。それぞれの反応が起こったドパミン濃度帯は異なり、PRS での抑制は 10 nM 以上で、IPL での活性化は 1 μM 以上で検出された (図 1b)。予想外の結果として、100 μM ドパミン灌流時に視細胞 PKA 活性の上昇が描出された (図 1a, 100 μM)。

次に、2 種類の視細胞、桿体と錐体のドパミン応答を比較するために、同じ実験で PRS 層を高い拡大倍率で撮影した。PKAchu 網膜では錐体の方が高い蛍光強度を示すため、桿体と錐体の活性を蛍光強度に基づいて抽出することができる [4]。分析の結果、桿体視細胞の基礎 PKA 活性が錐体よりも明らかに高いことが分かった (図 2a, Basal)。そして、桿体の高い PKA 活性はドパミンによって強く抑制された (図 2b, Rod)。一方、基礎活性が低い錐体での抑制はわずかで、逆にドパミン濃度が 100 μM に達した際に PKA 活性化が検出された (図 2b, Cone)。この結果から、図 1b で検出された高いドパミン濃度での視細胞 PKA 活性化は、錐体視細胞で生じていたことが分かった。

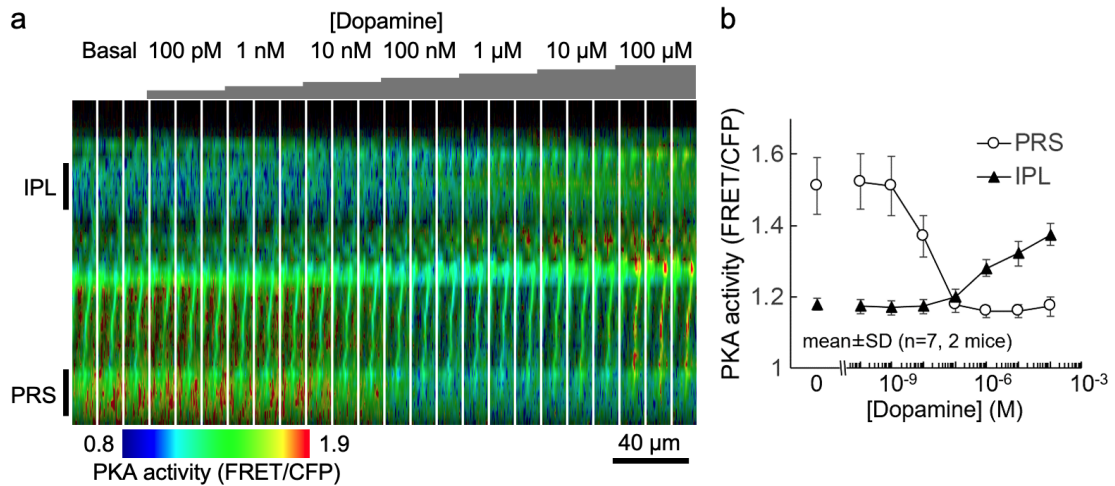


図 1. ドパミン灌流による網膜内 PKA 活性の変化

- a) 網膜の PKA 活性像。黄色とシアン蛍光強度の比 (FRET/CFP) を虹色疑似カラーで着色した。Z スタックの画像データを、上が網膜内層、下が網膜外層 (視細胞側) の XZ 面像に再構成し、10 分間隔のタイムラプス撮影を 24 フレーム分並べた。画像上に各時間帯の灌流液ドパミン濃度を示す。IPL: 内網状層、PRS: 視細胞内節・外節層。
- b) PKA 活性とドパミン濃度の関係。

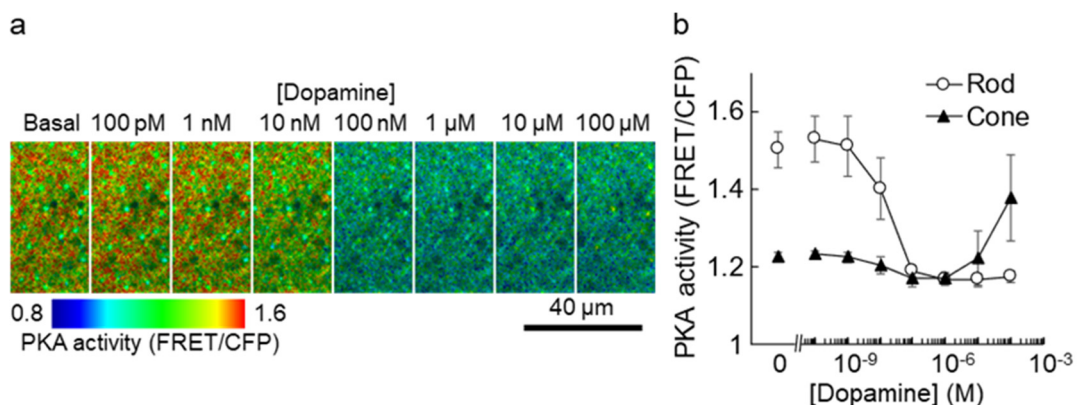


図 2. ドパミン灌流による桿体視細胞と錐体視細胞の PKA 活性変化

- c) PRS 層の PKA 活性像。図 1 では網膜を横から見る視点で示したが、こちらは上から見た視点で示す。各時間帯のドパミン濃度を画像の上を示す。ドパミン添加前の像 (Basal) で緑の輝点として見えるものが錐体視細胞で、その周りの輝度の低い領域は桿体視細胞。
- d) 桿体 (Rod) と錐体 (Cone) の PKA 活性とドパミン濃度の関係。

## 2. ドパミンは桿体視細胞の光感度を抑制する

PKA が抑制された際の視細胞の機能への影響を評価するために電気生理学的な測定を行った。単離した網膜から、イメージングと同様に灌流下で電位応答を測定することができる *ex vivo* ERG 法を用いた。この方法では、阻害剤カクテルを灌流に混合することで、視細胞以外の応答をブロックし、視細胞応答を単離して記録することができる。さらに、桿体の光情報伝達活性を欠損する *Gnat1*<sup>-/-</sup> マウスの網膜を用いることで、錐体応答も測定できる。なお、桿体は光感度が錐体の 30~100 倍高いため、錐体がほとんど応答できない弱いフラッシュ光を刺激に用いることで、野生型網膜から応答を記録できる。

測定では  $10 \mu\text{M}$  ドパミンを灌流した。この条件では、桿体 PKA は強く抑制される一方、錐体 PKA は基礎値とほとんど同じである (図 2b)。桿体フラッシュ光応答を一定間隔で経時的に測定したところ、波形がドパミンによって小さく、短くなっていく様子が観測された (図 3a, Rod)。この波形から、1 photon  $\mu\text{m}^{-2}$  のフラッシュ光に対する応答振幅で定義される Flash sensitivity 値を取り出してプロットすると、ドパミン灌流開始時点から急激に光感度が低下し、測定終了時点で基礎値の約半分まで低下したことが分かった (図 3b, Rod)。また、応答短縮を評価する目的で、高さを 1 に揃えた応答の面積値で定義される Integration time 値をプロットすると、これもやはりドパミン灌流開始時点から急激に低下していた (図 3c, Rod)。一方、錐体応答はドパミンにほとんど影響を受けなかった (図 3a~c, Cone)。

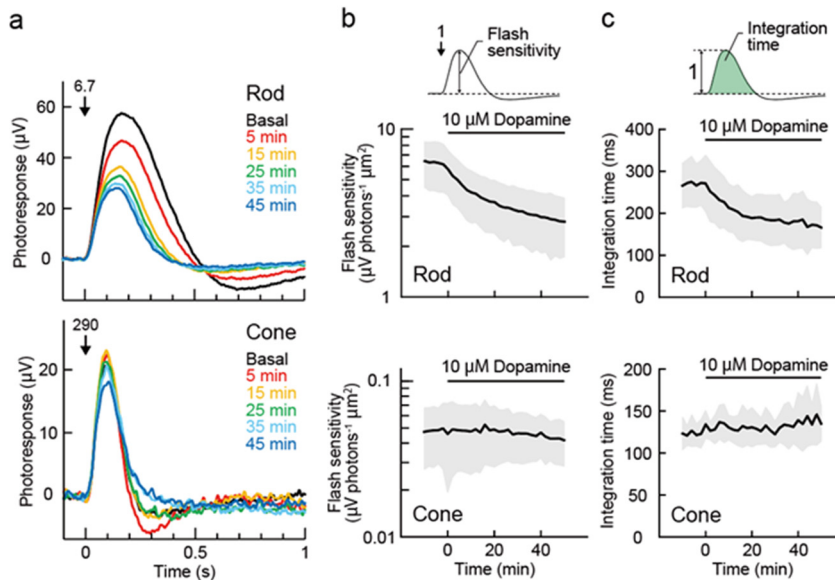


図 3. ドパミン灌流による桿体、錐体視細胞の光応答電位の変化

- 桿体 (Rod) と錐体 (Cone) の網膜電位。矢印はフラッシュ光照射タイミングで、その上の数値はフラッシュ光強度 (photons  $\mu\text{m}^{-2}$ )。時間表示は  $10 \mu\text{M}$  ドパミン灌流開始からの経過時間。
- フラッシュ光感度の時間経過。
- 正規化した応答波形の大きさ (Integration time) の時間経過。  
Rod は 6 網膜、Cone は 5 網膜の平均値で、灰色の帯は標準偏差。

## 考 察

本研究ではドパミンが網膜内層の細胞、桿体視細胞、錐体視細胞の PKA 活性に対して異なる影響を及ぼすことをライブイメージングで可視化した (図 1、2)。網膜内において、網膜内層に cAMP 濃度を上昇させる D1R ドパミン受容体が、視細胞に cAMP 濃度を低下させる D4R 受容体が発現することは既知の事実なので、網膜内層での活性化、桿体視細胞での抑制は予想通りの結果と言える。また、活性化は約  $1 \mu\text{M}$ 、抑制は  $10 \text{ nM}$  と応答するドパミン濃度が 2 桁異なることも、ドパミンの  $pK_i$  が D1R で  $4.3\sim 5.6$ 、D4R で  $7.6$  と  $2\sim 3$  桁異なること [9] と一致する。しかし、錐体 PKA が  $100 \mu\text{M}$  のドパミンで活性化するという結果は予想外だった。金魚では錐体軸索での D1R 発現が報告されている [10] ので、マウスでも錐体特異的な D1R 発現があるのかもしれない。この活性化は錐体視細胞に特異的、かつ、桿体と逆方向の応答という点で興味深く、今後その意義を研究していきたい。

視細胞光応答の電位測定では、桿体光応答が  $10 \mu\text{M}$  ドパミンで抑制された一方、錐体光応答はほとんど影響を受けなかった (図 3a)。イメージングでも、桿体 PKA 活性は  $10 \mu\text{M}$  ドパミンで強く抑制される一方、錐体 PKA 活性は基礎値とほぼ同じ値を示した (図 2b) ので、電位測定結果と PKA 活性変化はよく相関している。この結果は、PKA が

桿体の暗所視力を増強する役割を持つ、という仮説を支持する。しかし、その因果関係を証明するものではないため、今後は PKA を特異的に阻害する実験で、PKA と光感度の因果関係を明確に示したい。

PKA はどのような仕組みで光感度を調節し得るだろうか？桿体応答がドパミンで短縮したこと（図 3c）は、光応答終息過程の効率が上昇したことを示す。視細胞の応答終息は光活性化したロドプシン、および、その下流で連鎖的に活性化された各酵素を全て不活性化していく過程である。ロドプシン自身に対してはロドプシンキナーゼ GRK1 によるリン酸化とアレスチンの結合が起こる [1]。さらに、ロドプシン下流の G タンパク質トランスデューションに対しては RGS9 タンパク質複合体によって促進される GTP 加水分解反応が生じ、さらにその下流のホスホジエステラーゼが減少させた cGMP 濃度については、グアニル酸シクラーゼ活性化タンパク質群 GCAPs によって促進される cGMP 再合成が起こる [1]。PKA はこれらのタンパク質群の中では GRK1 [5] と RGS9-1 [6] をリン酸化して、それらの酵素活性を抑制することが報告されている。先述の通りこれらのタンパク質は応答終息を促進する酵素で、言い換えると光感度を抑制する酵素である。つまり、PKA は抑制酵素を抑制することで、逆に光感度を上昇させていると思われる（図 4）。なおドパミンは D4R を介して視細胞 PKA を阻害するので、抑制の抑制を抑制することで光感度を低下させている、と説明できる（図 4）。今後、このように幾重にも重なる複雑な調節が進化した経緯についても研究対象にしていきたい。



図 4. ドパミンは抑制の抑制を抑制することで光感度を低下させる

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学大学院医学研究科病態生物医学分野の松田道行教授である。

## 文 献

- 1) Vinberg F, Chen J, Kefalov VJ. Regulation of calcium homeostasis in the outer segments of rod and cone photoreceptors. *Prog Retin Eye Res.* 2018 Nov;67:87-101. Epub 2018 Jun 6. PMID: 29883715 DOI: 10.1016/j.preteyeres.2018.06.001.
- 2) Vinberg F, Kefalov VJ. Investigating the Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent mechanisms for mammalian cone light adaptation. *Sci Rep.* 2018 Oct 26;8(1):15864. PMID: 30367097 DOI: 10.1038/s41598-018-34073-8
- 3) Popova E. Role of Dopamine in Retinal Function. 2020 May 28. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995-. PMID: 32931183. (DOI は割当て無)
- 4) Sato S, Yamashita T, Matsuda M. Rhodopsin-mediated light-off-induced protein kinase A activation in mouse rod photoreceptor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Oct 27;117(43):26996-27003. Epub 2020 Oct 12. PMID: 33046651 DOI: 10.1073/pnas.2009164117.
- 5) Horner TJ, Osawa S, Schaller MD, Weiss ER. Phosphorylation of GRK1 and GRK7 by cAMP-dependent protein kinase attenuates their enzymatic activities. *J Biol Chem.* 2005 Aug 5;280(31):28241-50. Epub 2005 Jun 9. PMID: 15946941 DOI: 10.1074/jbc.M505117200
- 6) Balasubramanian N, Levay K, Keren-Raifman T, Faurobert E, Slepak VZ. Phosphorylation of the regulator of G protein signaling RGS9-1 by protein kinase A is a potential mechanism of light- and Ca<sup>2+</sup>-mediated regulation of G protein function in photoreceptors. *Biochemistry.* 2001 Oct 23;40(42):12619-27. PMID: 11601986 DOI: 10.1021/bi015624b

- 7) Kolesnikov AV, Chrispell JD, Osawa S, Kefalov VJ, Weiss ER. Phosphorylation at Serine 21 in G protein-coupled receptor kinase 1 (GRK1) is required for normal kinetics of dark adaptation in rod but not cone photoreceptors. *FASEB J.* 2020 Feb;34(2):2677-2690. Epub 2019 Dec 30. PMID: 31908030 DOI: 10.1096/fj.201902535R.
- 8) He J, Yamamoto M, Sumiyama K, Konagaya Y, Terai K, Matsuda M, Sato S. Two-photon AMPK and ATP imaging reveals the bias between rods and cones in glycolysis utility. *FASEB J.* 2021 Sep;35(9):e21880. PMID: 34449091 DOI: 10.1096/fj.202101121R
- 9) Beaulieu JM, Borrelli E, Carlsson A, Caron MG, Civelli O, Espinoza S, Fisone G, Gainetdinov RR, Grandy DK, Keabian JW, Langer SZ, Missale MC, Neve KA, Scatton B, Schwartz JC, Sedvall G, Seeman P, Sibley DR, Sokoloff P, Spano PF, Van Tol HHM. Dopamine receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE.* 2019; 2019(4). Available from: <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F20/2019.4>.
- 10) Mora-Ferrer C, Yazulla S, Studholme KM, Haak-Frendscho M. Dopamine D1-receptor immunolocalization in goldfish retina. *J Comp Neurol.* 1999 Sep 6;411(4):705-14. PMID: 10421879 DOI: 10.1002/(sici)1096-9861(19990906)411:4<705::aid-cne14>3.0.co;2-y