

cDNA Cloning and Characterization of Photoreceptor-specific Protein Visinin

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8125

光受容細胞に特異的な蛋白質 visinin の cDNA クローニングとその解析

金沢大学がん研究所薬理部 (主任: 三木直正教授)

山 形 要 人

(平成1年5月23日受付)

Visinin は、ニワトリ網膜視細胞 (錐体細胞) に特異的に存在する分子量約24,000, 等電点約5.5の可溶性蛋白質で、ふ卵14日目以後加齢と共に増加する蛋白質として見出された。Visinin の視細胞における機能を探るために、まず visinin complementary DNA (cDNA) のクローニングを行った。ニワトリ網膜の messenger RNA (mRNA) より、 λ gt11 ライブラリーを作成し、抗 visinin 血清でスクリーニングを行なった。約20万個のファージの中から、4個の陽性クローンが得られたが、すべて同じ cDNA インサートを含んでいた。この中の一つのファージ (λ vis4) を大腸菌 Y1089 にて溶原化し、 β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質を作らせ、visinin 抗体を用いて Western ブロットニングを行なったところ、イソプロピル β -D-チオガラクトピラノシドで誘導される融合蛋白質のみが反応した。また、エピトープ選択法で visinin に対する純粋な抗体を作成し、網膜蛋白質の Western ブロットニングを行うと、24kDa 蛋白質のみが反応した。さらに、この抗体を用いて網膜の免疫組織化学を行なったところ、視細胞内節に強い染色が認められた。Northern ハイブリダイゼーションより、visinin mRNA は網膜だけに発現しており、その長さは約1000塩基であった。また、visinin cDNA をプローブにして in situ ハイブリダイゼーションを行なったところ、網膜の視細胞内節および外顆粒層に多くのグレインがみられた。別のライブラリーをこの cDNA プローブでスクリーニングし、ほぼ完全長の visinin cDNA (λ vis25) を得た。このアミノ酸配列より、visinin が少なくとも2個の E-F ハンドをもち、カルシウムと結合する能力があると予想された。また、松果体においても visinin が発現しており、培養松果体に、4,000ルクスの光を4日間あて続けると、暗所で培養した場合に比べて有意に visinin 陽性細胞が増加することがわかった。以上の結果より、visinin は、光受容細胞のみに存在するカルシウム結合蛋白質であり、光により誘導されることから、カルシウムイオンを介する錐体細胞の光応答に関与している可能性が示唆された。

Key words photoreceptor cells, cDNA cloning, calcium-binding, photo-transduction, visinin

網膜は、光刺激をうけ、それを電気信号に変え、統合処理した後、その情報を脳へ送る神経組織である。網膜は、視細胞層と神経細胞層に大別され、視細胞は、直接光を受容し、それを生体信号に変える役目をしており、桿体細胞と錐体細胞からなる。この二種類

の細胞の光応答は異なっており、桿体は感度が高く、光の弱いところで働き、明暗視に関係しているのに対し、錐体は、感度が低く、光の強いところで働き、色覚に関係している。従って、これらの視細胞の波長特性も異なっている。つまり桿体視物質のロドプシンの

Abbreviations: bp, base pairs; BSA, bovine serum albumin; cDNA, complementary DNA; cGMP, cyclic GMP; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FCS, fetal calf serum; IPTG, isopropyl β -D-galactopyranoside; mRNA, messenger RNA; ORF, open reading frame; PAGE, polyacrylamide gel

吸収極大波長が 495nm であるのに対し、三種の錐体視物質の吸収波長はそれぞれ青 (420nm)、緑 (530 nm)、赤 (560nm) となっている。これは光受容物質が異なるためである。桿体外節における光刺激を電気信号に変える機構 (光変換機構) はよく研究されている¹⁾。

光刺激を受けた後、桿体細胞外節では、ロドプシンが、メタロドプシン II になり、トランスデューシンの α サブユニットを活性化する。そして α サブユニットが β γ サブユニットから離れ、cyclic GMP ホスホジエステラーゼ (cGMP phosphodiesterase (PDE)) の γ サブユニットに結合すると、PDE が活性化され、cGMP が急速に分解される。cGMP は、桿体外節形質膜の Na^+ チャンネルに直接作用してこれを開く作用²⁾があるので、cGMP が減少した結果、外節の Na^+ チャンネルが閉じ、過分極を引き起こすと考えられている。このような反応が錐体細胞外節でも起こっていると考えられているが、まだよくわかっていない。また、網膜の神経細胞層には、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞の 4 種類の細胞があり、光情報を処理している。

光応答のために、網膜、特に視細胞には他の組織にはみられない特異的な蛋白質が発現している。代表的なものとして、上記の反応に関与する、オブシン³⁻⁵⁾、トランスデューシン⁶⁻⁸⁾、cGMP ホスホジエステラーゼ^{9,10)}、色覚物質 (青、赤、緑)^{11,12)}、cGMP 依存性 Na^+ チャンネル、S 抗原¹³⁾ などが知られている。近年、遺伝子操作により、これらの構造がわかってきた。

Visinin は 1983 年に畠中ら¹⁴⁾ が、発達期ニワトリ網膜に特異的な蛋白質として見出したもので、抗 visinin 血清を用いた免疫組織化学的研究により、錐体細胞の内節に多く含まれ、桿体細胞には存在しないことがわかっている¹⁵⁾。しかし、その構造および機能は明らかでない。本論文では visinin の錐体細胞内での機能を探るために visinin complementary DNA (cDNA) のクローニングを行い、その諸性質を調べた。

材料および方法

I. ニワトリ網膜 λ gt11 cDNA ライブラリーの作成

ニワトリ胚 (19日齢) 網膜からの RNA の単離は、

Chirgwin らの方法¹⁶⁾に従った。網膜組織を 4 M グアニジウムチオシアネート溶液中で粉砕し、それを 5.7 M 塩化セシウムに重層し、ベックマンローター SW 50.1 で 35krpm、14時間遠心し、全 RNA を得た。抽出した全 RNA を Aviv らの方法¹⁷⁾に従いオリゴ (dT) セルロースカラムにかけ、ポリ (A)⁺RNA を得た。ニワトリ網膜の λ gt11 cDNA ライブラリー作成は、Huynh らの方法¹⁸⁾に従った。まず、ニワトリ網膜ポリ (A)⁺RNA 10 μ g より、Gubler と Hoffmann の方法¹⁹⁾に従ってオリゴ (dT) プライマーをポリ (A)⁺RNA にアニールした後、逆転写酵素を用いて一本鎖 cDNA を合成した。次に大腸菌 RNaseH で、RNA/DNA ハイブリット中の RNA にニックをいれ、大腸菌 DNA ポリメラーゼによって RNA 鎖を DNA 鎖に置き換えた。最後に、T4DNA ポリメラーゼにより、3' 末端の突出を除去した。合成された cDNA の内在性 EcoRI 部位を EcoRI メチラーゼによってメチル化し、両端に EcoRI リンカーを付けた後、EcoRI で消化した。その後、Bio-gel A50m カラム (0.2 \times 30cm) にのせ、STE (10mM トリス塩酸、pH 7.5, 1mM EDTA, 100mM 塩化ナトリウム) で溶出し、 λ gt11 ベクター (EcoRI 消化、フォスファターゼ処理済み) の EcoRI 部位に挿入した後、in vitro パッケージングによってファージライブラリーを作成した。 λ gt11 ライブラリーを大腸菌 Y1088 に感染させ、独立クローンの数を調べると、ファージアーム 1 μ g 当たり約 2×10^5 個のクローンを含んでいた。

II. 抗 visinin 血清による λ gt11 ライブラリーのスクリーニング

大腸菌 Y1090 に λ gt11 ライブラリー (2×10^5 plaque forming unit (pfu)) を 37°C、15分間感染させ、トップアガルとともにプレート (直径 90mm) 7 枚 (約 3×10^4 pfu/枚) にまき、42°C で 4 時間培養後、10mM IPTG をしみこませたナイロンフィルター (82mm) を各プレートの上におき、3 時間、37°C で培養した。その後、フィルターをはずし 0.5% スキムミルク/phosphate-buffered saline (PBS) 中で 37°C、1 時間培養し、抗 visinin 血清 5ml (1000倍希釈) と室温で一晩反応させた。その後、tris-buffered saline (TBS) (50mM トリス塩酸、pH 8.0, 150mM 塩化ナトリウム) 中で 10分間、0.1% ノニデット P-40/TBS 中で 10分間、再び TBS 中で 10分間洗い、ペルオ

electrophoresis; PAP, peroxidase-antiperoxidase; PBS, phosphate-buffered saline; PDE, phosphodiesterase; pfu, plaque forming unit; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, solution containing 0.15M NaCl + 0.015M sodium citrate; TBS, tris-buffered saline

キシダーゼでラベルした抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ) 5ml (1,000倍希釈) と 37°C で 1 時間反応させた。その後、上と同様に洗い、ペルオキシダーゼ用の発色液 40ml (3,3' ジアミノベンチジン 10mg, 30% 過酸化水素 15 μ l, 0.1M トリシュー塩酸, pH 7.4) 中で発色させた。

III. Southern ハイブリダイゼーション

高分子量 DNA は、Blin らの方法²⁰⁾に従い、ニワトリ肝臓から調整した。得られた DNA を、BamH I および EcoR I で処理した後、0.8% アガロースゲル電気泳動を行なった。Southern 法²⁰⁾により、ナイロン膜 (Gene Screen 社, 米国) へ DNA をトランスファーした後ハイブリダイゼーション溶液 (50mM トリシュー塩酸, pH 7.5, 1 M 塩化ナトリウム, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), $\times 10$ Denhardt 溶液, 0.1% サルコシル, 500 μ g/ml 変性白子 DNA) 中で、65°C, 16 時間反応させた。その後フィルターを $\times 2$ SSC ($\times 1$ SSC = 0.15M 塩化ナトリウム + 0.015M クエン酸ナトリウム) (室温), $\times 2$ SSC/0.1% サルコシル中, 65°C で 20 分ずつ 3 回洗い, 再び $\times 2$ SSC (室温) で洗った後, オートラジオグラフィを行った。

IV. Northern ハイブリダイゼーション

ニワトリ網膜, 脳, 肝臓, 心臓, 小腸, 腎臓などから, 全 RNA を調整し, 各 60 μ g ずつグリオキサールで変性させ, 1% アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後, RNA をナイロン膜 (Pall 社, 米国) にトランスファーした後, Northern ハイブリダイゼーションを行った。プローブは Southern ハイブリダイゼーションと同じプローブを用いた。ただし, この後の洗いは, $\times 0.1$ SSC/0.1% サルコシル (65°C) で 20 分間ずつ 3 回行った。

V. プラークハイブリダイゼーション

プラークハイブリダイゼーションは, Benton-Davis の方法²⁰⁾に従い, Northern ハイブリダイゼーションと同じプローブを用いてスクリーニングを行なった。すなわち 3×10^4 pfu/枚になるように, ニワトリ網膜 λ gt11 ライブラリー (計 6×10^8 pfu) をまき, 固定した後, Northern ハイブリダイゼーションと同じ条件で反応させた。Northern ハイブリダイゼーションと同じように膜を洗った後, オートラジオグラフィを行なった。

VI. エピトープ選択法による抗体の精製とウエスタンブロットティング

λ vis4 (~10000pfu) をアンピシリンを含むプレート (90mm) にまき, 42°C で 6 時間保温後, 10mM

isopropyl β -D-galactopyranoside (IPTG) をしみこませたナイロン膜をのせ, 37°C で 2 時間保温した。ナイロン膜をはずし, 0.5% スキムミルク/PBS 中で 37°C, 1 時間反応後, スクリーニングに用いた抗 visinin 血清 (1,000倍希釈) 各 5 ml 中で一晩室温で保温した。0.5% トリトン X-100 を含むスキムミルク液で 10 分間ずつ室温で 3 回膜を洗った後, 蒸留水で膜を洗浄し, プラークの蛋白質を結合させた面を上にして, 新しいシャーレに移し, 2 ml の溶質溶液 (5mM グリシン溶液, pH 2.3, 0.15M 塩化ナトリウム, 0.1 mg/ml bovine serum albumin (BSA)) を入れ, 膜面上で 1 分間揺らして水中の試験管に移し, 同様に 2 ml, さらに 1 ml の溶質溶液で溶出させた。すぐに 1 M トリス 70 μ l を加え, 抗体溶液として用いた²⁰⁾。Western ブロットティングは, Towbin らの方法²⁰⁾に従った。すなわちニワトリ胚 19 日齢の脳, 網膜, 肝臓, 腎臓, 小腸の各可溶性分画 50 μ g を 12.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) で分離した後, 25mM トリス, 192mM グリシン, 20% メタノール中電気泳動的にニトロセルロース膜へ転写した。その後ニトロセルロース膜を 0.5% ノニデット P-40/PBS 中でひたし, SDS を除いた後, 3% BSA/PBS 中で 37°C, 1 時間保温し, 抗 visinin 抗体と一晩室温で反応させた。以後は, 抗体によるライブラリーのスクリーニングと同じ方法を用いた。

VII. 溶原菌からの融合蛋白質の精製

λ vis4 ファージを Y1089 に 32°C, 20 分間感染させ, その後プレートにまき, 32°C で培養した。1 個ずつコロニーをグリットつきのフィルター 2 枚に爪楊枝で移した後, 1 枚は 42°C に, 1 枚は 32°C で培養した。32°C で成育し, 42°C で成育しないコロニーを選び, 溶原菌とした。この溶原菌を, 30ml の培養液 2 本に入れ, 32°C で成育させ, O.D.600 = 0.5 の時点で, 45°C の恒温槽へ移し, 20 分間培養した後, 10mM になるように IPTG 加え, 37°C で培養した。融解が起こる前に集菌し, 0.6ml の 10mM トリシュー塩酸 (pH 7.5) で懸濁し, -70°C で凍結させた。その後凍結融解を 2 度くり返し, トリトン X-100 を最終濃度 1%, リゾチームを 1 mg/ml になるように入れ, 4°C で 30 分間反応後, 遠心し, その沈殿を用いた。

VIII. 塩基配列の決定

Sanger らが開発²¹⁾し, Messing によって改良された²⁰⁾ジデオキシ法を用いて, visinin cDNA の塩基配列を決定した。DNA 断片を M13 mp18 及び mp19 に組み込み JM101 に導入した後, 一本鎖ファージを増

殖し、その DNA を回収した。相補鎖 DNA の合成は、ジデオキシヌクレオチドおよび Klenow フラグメント、あるいはシーケเนส存在下で 4 種の色素プライマーを用いて行なった。6%ポリアクリルアミド (8.3M 尿素を含む) ゲルを用いて、シークエンサー 370A (ABI 社, 米国) にて塩基配列を決定した。

IX. In situ ハイブリダイゼーション

ふ卵後 3 日目のニワトリを、4%パラホルムアルデヒド/PBS で灌流固定後、眼球を摘出し、同液で後固定を行い、10~20 μ m の凍結切片を作製した。プローブは、Northern ハイブリダイゼーションと同じプローブを用い、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{S}]\text{-dCTP}$ でニックトランスレーションラベルした後、50mM リン酸緩衝液 (pH 7.5)、50%ホルムアルデヒド、 $\times 2$ SSC、 $\times 1$ Denhardt、2%サルコシル、0.29M 2-メルカプトエタノール、250 μ g/ml 変性白子 DNA、100mg/ml デキストラン硫酸中で、プレハイブリダイゼーション後、プローブ DNA を入れ、37°C で 14 時間ハイブリダイゼーションさせた。洗いは、 $\times 2$ SSC、室温で 30 分間の後、 $\times 0.1$ SSC/0.1% トリトン X-100 中で 50°C、40 分間ずつ 3 回行なった。

X. 免疫組織化学

ふ卵後 3 日目のニワトリを同様に固定後、凍結切片を切り出し、3% BSA/PBS 中で 1 時間反応後、エピトープ選択法で純粋にした抗体と反応させた。発色は peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法を用いた²⁰⁾。

XI. ドットプロットイング

ふ卵後、3000~4000ルクス下で 3 日間飼ったニワトリ 3 羽と、暗所で 3 日間飼ったニワトリ 3 羽よりそれぞれ松果体を摘出し、そのホモジネートをニトロセルロース膜に 10, 20, 40 μ g ずつのせた後、抗 visinin 抗体を用いて、イムノプロットイングを行なった。

XII. 松果体の培養

ふ卵直後のニワトリより松果体を摘出し、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/10% fetal calf serum (FCS) の培養液、10% CO₂ の 37°C 恒温槽中で、一方は 4,000ルクスの蛍光灯下、もう一方は暗所で 4 日間培養した。組織化学は上述と同じ方法で行なった。

XIII. 試薬類

実験に使用した酵素および薬品は下記から得た。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (3,000Ci/mmol), $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$

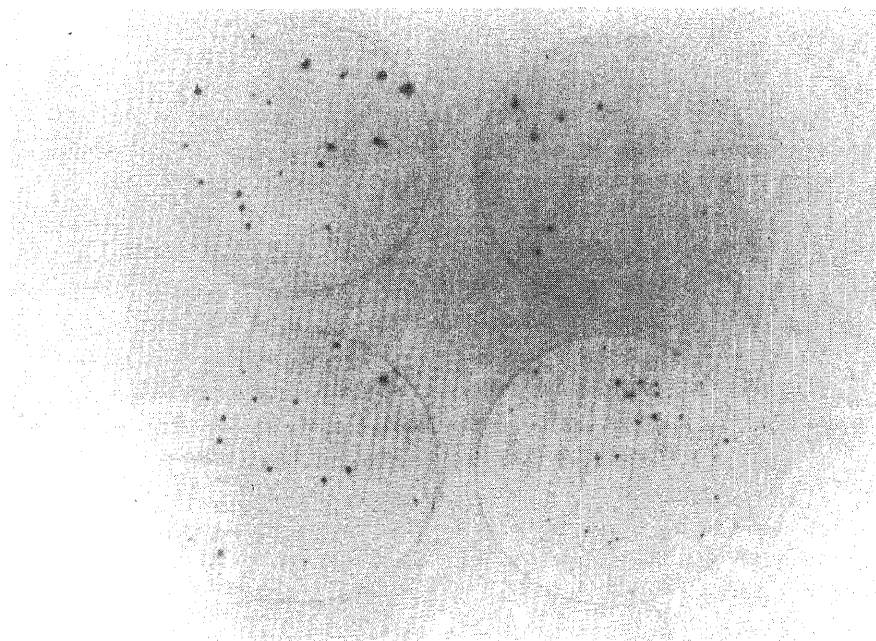


Fig. 1. Screening of a chicken retinal λ gt11 library by using anti-visinin serum. The λ gt11 cDNA library was screened by using anti-visinin serum. Four positive clones were isolated from about 2×10^5 recombinant cDNA clones. These clones contained the same cDNA insert (620 bp). The spots on each filter represent positive clones.

(3,000Ci/mmol) (Amersham, 英国), λ gt11, ブルー スクリプトベクター, in vitro パッケージングキット (Stratagene, 米国), アンピシリンナトリウム, テトラサイクリン塩酸塩, イソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド (和光, 大阪), 5-プロモ-4-クロロ β -D-ガラクトシド (半井, 京都), 制限酵素 EcoR I, Pst I, PvuII, DNA ポリメラーゼ I, M13mp18 および mp19 (東洋紡, 大阪), T4DNA ライゲーションキット, バクテリアルアルカリホスファターゼ, DNA ポリメラーゼクレンウフラグメント (宝酒造, 京都), 制限酵素 Kpn I (ベーリンガーマンハイム, 西独), ナイロンフィルター (GeneScreen, 米国) ナイロンフィルター (Pall, 米国), X線フィルム (Kodack, 米国), ダイプライマー (アプライドバイオシステム, 米国).

成 績

I. Visinin cDNA のクローニング

Visinin cDNA をクローニングするために, まず, visinin が多く発現しているニワトリ胎児 (19日齢) 網膜の cDNA ライブラリーを作成した. ベクターは, λ gt11 発現ベクターを用い, IPTG を加え, β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質を発現させた後, ニワトリ visinin に対するウサギ抗血清を用いてスクリーニングした. 約20万個のクローンより, 4個の陽性クローンが得られた (図1). これらの陽性クローンのファージ DNA を抽出し, cDNA の制限酵素地図を作製すると, 4個とも同一であった. そこで, そのうちの1つ (λ vis4) の cDNA を pUC18 の EcoR I 部位にサブクローニングし, 以後の実験の DNA プロープとして

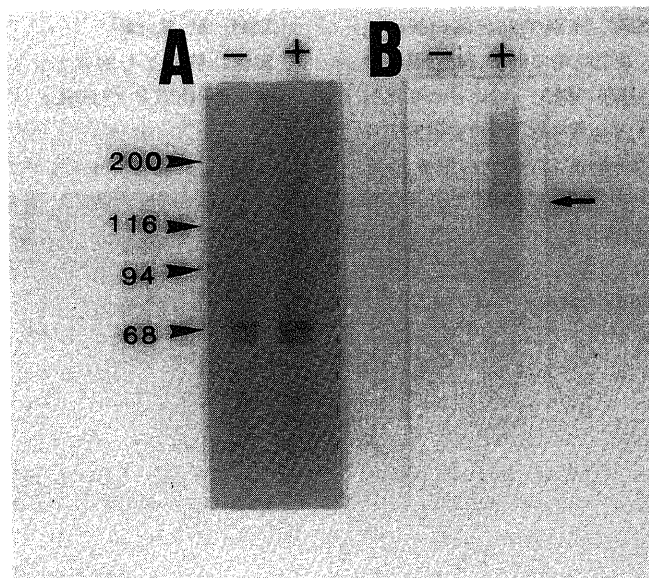


Fig. 2. Induction of the β -galactosidase-visinin fusion protein by IPTG. Lysogens of λ vis4 were induced with (+) or without (-) isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). After the induction, cells were collected and lysed. The cell lysates were electrophoresed on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel. The separated proteins were transferred to a nitrocellulose filter and reacted with anti-visinin serum. A single protein band was detected by visinin serum. The figures on the left side indicate kDa. A: Coomassie blue stain. B: Immunoblot with anti-visinin serum. The arrow indicates the fusion protein.

用いた (図3). また, この陽性ファージの産生する β -ガラクトシダーゼ-visinin 融合蛋白質が, スクリーニングに用いた抗体と反応するかを確かめるために, λ vis4 を大腸菌 Y1089 に感染させ, 溶原化した. この溶原菌より, IPTG を加えることによって β -ガラクトシダーゼ-visinin の融合蛋白質を作らせ, それを部分

精製した後, Western プロットティングを行った (図2). IPTG を加えることによって, 融合蛋白質が発現し, しかも, スクリーニングに用いた抗体と反応したことにより, このファージクローンが, 抗血清と反応する融合蛋白質を作っていることが確認された. 得られた cDNA の長さは, 約620塩基対であり, 完全長

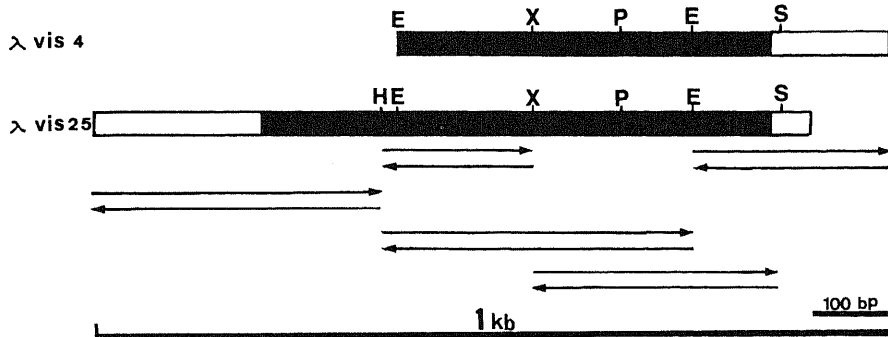


Fig. 3. Restriction enzyme maps and sequencing strategy of λ vis4 and λ vis25. The solid and open boxes indicate the coding and non-coding regions, respectively. The arrows under the cDNA indicate the direction and extent of sequence determination for each fragment. All nucleotide sequences were determined in both strands. E, EcoRI; H, HaeIII; P, Pst I; S, Sma I; X, Xho I.

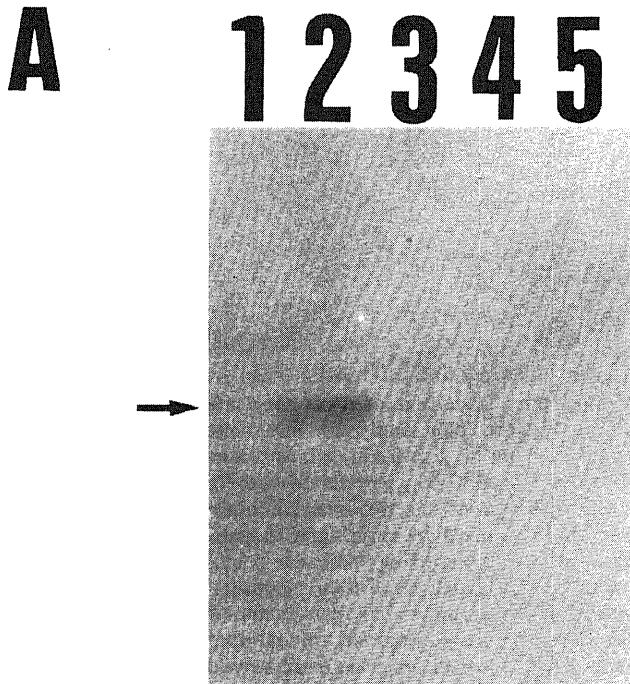


Fig. 4

(~1,000塩基対)に足りないため、得られた cDNA の 5' 側の EcoR I 断片をプローブにして、別のニワトリ網膜 λ gt11 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。約60万個のクローン中に、約60個の陽性プラークが認められ、最終的に16個の陽性クローンを単離した。そのうちの一つ (λ vis25) の cDNA 断片を切り出し、ブルースクリプト KS (+) の Kpn I-Sac I 部位にサブクローニングした。このクローンの cDNA (λ vis 25) の長さは861塩基対 (図 3) で、以前に得られた cDNA の 3' 側と合わせると全体で (~950塩基対) となり、ほぼ完全長であった。

II. エピトープ選択法による抗 visinin 抗体の精製
Visinin は、分子量および等電点などの近似性から、

カルビンジン (calbindin) を精製の過程で完全に除くことができなかった。実際、中枢神経や腎臓での抗 visinin 血清を用いての免疫組織化学で、その染色パターンは、カルビンジンの分布と非常によく似ていた²⁰。これは抗 visinin 血清の一部がカルビンジンと反応したためだろうと考えられた。またカルビンジンであらかじめ血清を吸収すると、小脳や腎臓と反応しなくなるのが免疫組織化学的にも、Western ブロットティングにおいても確かめられた。しかし、ニワトリ網膜においては、抗 visinin 血清をカルビンジンで吸収しても、光受容細胞 (錐体細胞) に染色が認められる²⁰ ことにより、visinin はカルビンジンとは異なる物質であると考えられていた。そこで、今回クローニン

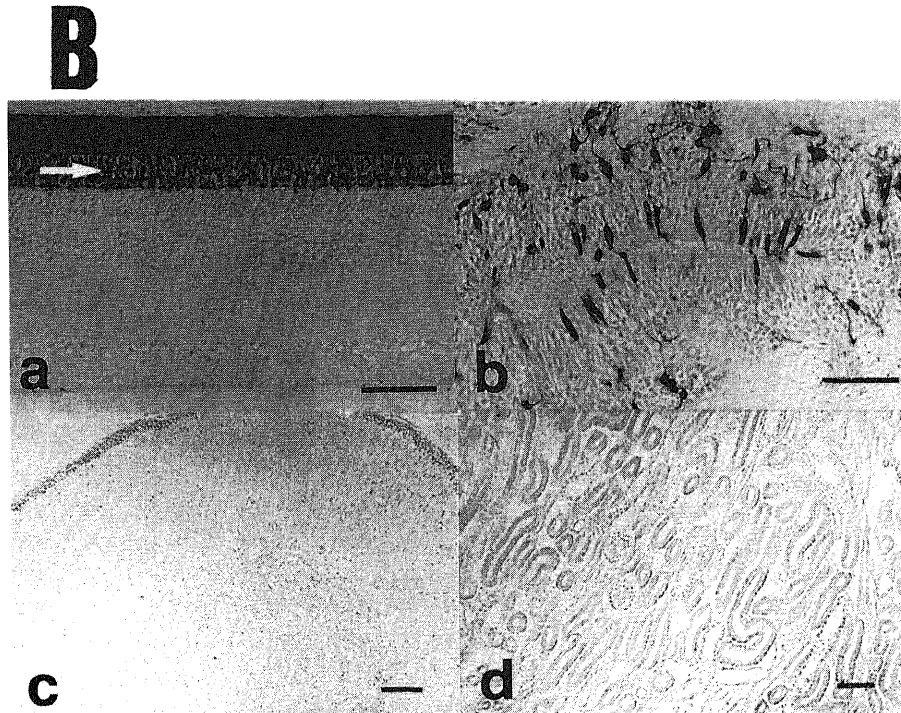


Fig. 4. Western blot and immunohistochemical characterization with epitope-selected antibody. A. Western blot analysis with epitope-selected visinin antibody. Total proteins (about 50 μ g) from various tissues were separated by electrophoresis on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel and blotted to a nitrocellulose filter and then epitope-selected anti-visinin antibody was applied. The reacted antibody was visualized by reacting with anti-rabbit IgG-peroxidase and 3,3'-diaminobenzidine. An arrow indicates a position of visinin in chicken retinal soluble protein. Chick brain (lane 1), retina (lane 2), liver (lane 3), kidney (lane 4) and intestine (lane 5). B. Immunohistochemistry with epitope-selected visinin antibody. Retinal (a), pineal (b), cerebellar (c) and renal (d) sections from 3-days-old chicken were reacted with the epitope-selected visinin antibody. The photoreceptor cells were indicated by a white arrow in (a). The bars represent 50 μ m.

グした陽性ファージを Y1090 に感染させ、IPTG で融合蛋白質を作らせ、抗 visinin 血清と一晚室温で反応させた。その後、TBS/トウイーン20溶液で3回洗うことによって非特異的に吸着している抗体を除去した後、5 mM グリシン溶液 (pH 2.3) で融合蛋白質と特異的に反応している抗体を溶出、回収した。この抗 visinin 抗体を用いて、各組織の可溶性分画との Western プロットティングを行った (図 4A)。網膜の 24kDa の蛋白質とのみ反応し、他の組織には反応する蛋白質が認められなかった。また、組織化学的にも、ニワトリ網膜の光受容細胞 (錐体細胞) とのみ反応し、カルピンジンが多く認められる小脳のプルキンエ細胞、腎臓とは全く反応しなかった (図 4B)。以上のこと

より、今回クローニングした cDNA は、ニワトリ網膜錐体細胞のカルピンジンとは異なる 24kDa 蛋白質 (visinin) をコードしていると考えられた。

III. Northern ハイブリダイゼーションと Southern ハイブリダイゼーション

Visinin messenger RNA (mRNA) の網膜特異性およびその長さを調べるために、その cDNA (EcoR I 断片, 365塩基対) をプローブにし、19日目のニワトリ胚の各組織から抽出した RNA を用いて Northern ハイブリダイゼーションを行った (図 5)。Visinin mRNA は、約 12S (約1,000塩基) で、網膜だけに発現しており、他の脳、小腸、腎臓などには認められなかった。また、同じプローブを用いて、BamH I あるいは EcoR I で消化したニワトリゲノム DNA と Southern ハイブリダイゼーションを行なうと、各々反応するバンドが一本だけ認められ、visinin 遺伝子は単一コピーであると考えられた (図 6)。

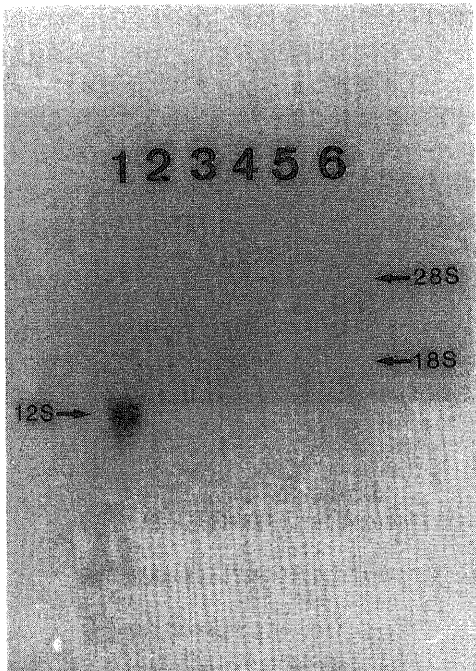


Fig. 5. Northern analysis by using visinin cDNA as a probe. Total RNAs were extracted from the retina (lane 1), brain (lane 2), liver (lane 3), heart (lane 4), intestine (lanep5) and kidney (lane 6) from 19-day-old chick embryos by the guanidine method and applied on a 1% agarose gel (about 60 μ g RNA/lane), and transferred to a nylon filter. The filter was hybridized with nick-translated EcoR I fragment (365 bp). After washing at high stringency, it was exposed to a X-ray film. Positions of 28S and 18S ribosomal RNAs are shown on the right side as molecular size marker.

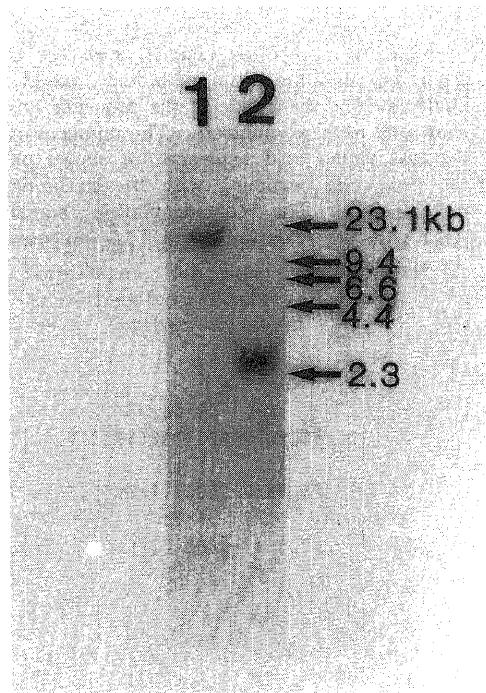


Fig. 6. Southern analysis by using a visinin cDNA probe. The genomic DNA isolated from a chick liver was digested with BamH I (lane 1) and EcoR I (lane 2), and applied on a 0.8% agarose gel (about 20 μ g/lane) and transferred to a nylon filter. The filter was hybridized with nick-translated EcoR I fragment (365 bp), washed with $\times 2$ SSC, and exposed to a X-ray film. Reference markers are in kilobases.

-201 TTTCAAAAAGCTAAGTTTATT
 -180 TATGCAATTGAAAATAGCCCTCTACTGCTCCCTCCGCCATACCGCCCATACGCC
 -120 ACCCCCAATGCCCCCAATTACTTTCTCCGCCCAATGCCCCCAATCAATTAAT
 -60 CCACCCCAATCTCCGCCCAATATAAGCCCTCCGCCCTCCCGCTCCACAGC
 1 ATGGGGAACAGCCGACGAGCGCTCTGTCCGGAGGTCTCCAGGACTGCGCGCTCCA
 MetGlyAsnSerArgSerAlaLeuSerArgGluValLeuGlnAspCysAlaProPro 20
 61 CTGCGTTACACGGAGGAGGAGCTGAGCCGTGGTACGAGGCTTCCAGCGCAGTCTCC
 LeuArgTyrThrGluGluLeuSerArgTyrPyrGluGlyPheGlnArgGlnCysSer 40
 121 GACGCGCGATCCGCTCGGATGAATTCGAGCGCATTACGCGCACTTCTTCCCAAATCG
 AspGlyArgIleArgCysAspGluPheGluArgIleTyrGlyAsnPhePheProAsnSer 60
 181 GACGCTCAGGGCTACGCGCGCACCTCTCAGGAGCTTCGACCAACAAGCAGCAGCGAC
 GluProGlnGlyTyrAlaArgHisValPheArgSerPheAspThrAsnAspAspGlyThr 80
 241 TTGACTTCAGGAGTACATACAGCGCTGCACCTCACTGCTGCGGGAAGACCCACTG
 LeuAspPheArgGluTyrIleIleAlaLeuHisLeuThrSerSerGlyLysThrHisLeu 100
 301 AAGCTCGAGTGGGCTTCTCTTGTTCGAGCTGGACCGCAACGGGAGGTGACGAGAGC
 LysLeuGluTrpAlaPheSerLeuPheAspValAspArgAsnGlyGluValSerLysSer 120
 361 GAGGTGCTGAGATCATACGCGCATCTTCAAGATGATCCGAGGAGGAGCGGCTGCAG
 GluValLeuGluIleIleThrAlaIlePheLysMetIleProGluGluGluArgLeuGln 140
 421 CTGCGCGAGGATGAGACAGCCCAAAAACGGGCGCAAACTGTGGGCTATTTCAAC
 LeuProGluAspGluAsnSerProGlnLysArgAlaAspLysLeuTrpAlaTyrPheAsn 160
 481 AAAGGGGAAACGATAAGATCGCCGAGGGGAATTCATTGACGGGTGATGAAGAAGC
 LysGlyGluAsnAspLysIleAlaGluGlyGluPheIleAspGlyValMetLysAsnAsp 180
 541 GCCATTATGCGCTCATCAATACGAAACCAAGAATAATGGGGGGGACCCCAATTT
 AlaIleMetArgLeuIleGlnTyrGluProLysLys***
 601 GGGGGGGGGGCGATTGAGAGCCCGGGGGGGGATTAATTAATGAGGGGGTGGTTAA
 661 TTAATGGGGGGGGGCGATTAGAGTGAATTAATGGGGGGGAGGGGAATAAAGTGAT
 721 GCGGAGAAA

Fig. 7. Nucleotide sequence of visinin cDNA and a deduced amino acid sequence. Nucleotide sequence are numbered on the left side, beginning with the first residue of the ATG triplet encoding the initial methionine, and the nucleotides on the 5'-side of the sequence are shown by negative numbers. The numbers of deduced amino acid sequence are shown on the right side beginning with the initiating methionine. The polyadenylation signal AATAAA are underlined and *** indicates the stop codon.

IV. Visinin の一次構造

Sanger のジデオキシ法を用いて visinin の cDNA の全塩基配列を決定した (図 7). Visinin cDNA は非翻訳領域201塩基対, 翻訳領域576塩基対, 3' 非翻訳領域174塩基対からなり全体で951塩基対であった. visinin mRNA は約 1 kb でポリ (A)⁺ が約 100あると考えれば, この cDNA はほぼ完全長であろうと考えられた. 推定される visinin の分子量は 22,452, 等電点は約5.0で visinin 蛋白質のデータ (分子量や等電点) とほぼ一致していた. 3' 非翻訳領域には, ポリ (A)⁺ 鎖18塩基上流にポリ (A)⁺ 付加シグナル (AATAA) が認められた. アミノ酸配列より, visinin と他の蛋白質とのホモロジーを調べると, カルモジュリン, トロポニンCとそれぞれ相同性が認められた (図 8) が, ビタミンD依存性カルシウム結合蛋白質のカルビンジンとの相同性は認められなかった. しかも, その相同部位をみると, カルシウム結合部位およびその周囲の α -ヘリックスにホモロジーが高く, visinin が, 少なくとも2つの E-F ハンド構造を持つことが予想された. またN末側にも同様の構造が認められるが, 典型的な E-F ハンド構造をとらず, 実際は, カルシウムが結合しない可能性がある. β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質ができる読み方は1通りしかなく, そのフレーム以外は, 長いオープンリーディングフレーム (open reading frame (ORF)) はとれなかった. また, 一番長い ORF の5' 非翻訳領域には, 3個の終止コドン (-138番目の TAA, -81番目

		O-O -OG-IO--E		D-O-OG-IO--E	
VS	32	YEGFQRQCSQDGRIRCFDEFERIVGNFFPNSEPGQYARHVFRSFDTNDGGTLDFREYIIAL--HLT	93		
		: :		: : :	
CM	16	FSLFDRD-GDGCITTHLGLTVMSRL-GQNPTAEALQDMVGEVDADGSGTIDFPEFLSLM-ARKM	76		
		:			
TC	26	FDMFDAD-GGGDISTKELGTYM-RHLGQNPTKEELDAIIEVDEDDSGTIDFEEFLVMVYRQMK	87		
		D-O-OG-IO--E			
VS	94	S-S-GK-THLKLEWAFSLFDVDRNGEVSKSEVLEIITAIFKNIPEEERL	139		
		:			
CM	77	R-D-SD-SEEEIREAFRVFDKDNQYISAAELRHVMTNLGKELTDEVD	122		
		: : :			
TC	88	EDAKGX-SEELADCFRIFDKNADGFIDIEELGELRATGEHVTEED	133		

Fig. 8. Homology of visinin with calcium-binding proteins. The amino acids are expressed as the single letter. The essential amino acids for calcium-binding domains are marked above the sequences: O, oxygen containing residue; G, glycine; I, isoleucine; E, glutamate. VS, visinin; CM, calmodulin; TC, troponin C. The symbols, | and: represent the matching of the same and similar amino acids, respectively.

の TAG, -33 番目の TAA) が存在し, 1 番目の ATG から翻訳領域が始まることが考えられた.

V. In situ ハイブリダイゼーション

Visinin mRNA の網膜での局在を調べるために, ニワトリ網膜(生後 3 日)を用いて, in situ ハイブリダイゼーションを行った. プローブは Northern ハイブリ

ダイゼーションに用いたのと同じプローブを用い, [α - 35 S]-dCTP でニックトランスレクションした. 網膜の視細胞内節および外顆粒層に多くのグレインが認められ, 視細胞層に visinin mRNA が発現していることがわかった(図 9).

VI. 松果体における visinin の発現と光による誘導

松果体は, 発生学的に, ニワトリにおいては, まだ光受容細胞と内分泌細胞が混在していると言われている. エピトープ選択法によって精製した visinin 抗体を用い, ニワトリ松果体の免疫組織化学を行ったところ, 陽性細胞が認められた(図 4B-b). つまり, 錐体細胞に特異的な visinin が松果体細胞にも発現していた. そこで, ふ卵直後のニワトリより, 松果体を摘出し, DMEM/10% FCS 中, 10% CO₂ 下で, 一方は,

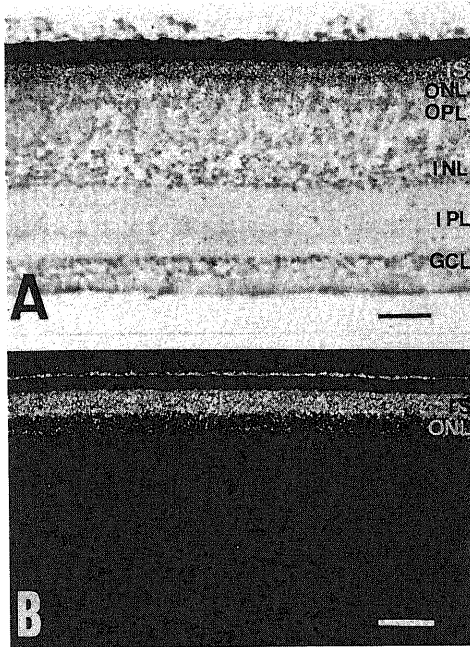


Fig. 9. In situ hybridization of the retina by using a visinin cDNA probe. Frozen section of 3-day-old chick retina was hybridized to 35 S-labeled visinin cDNA. After hybridization and washing, the section was dipped in NTB-2 emulsion and exposed for 2 weeks at 4°C before development. (A); Giemsa stain, bright field illumination. (B); Dark field illumination of the same section. The radioactivity is concentrated in the inner segment (IS) and the outer nuclear layer (ONL). The followings are illustrated; IS, inner segments; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. The bars are 50 μ m.

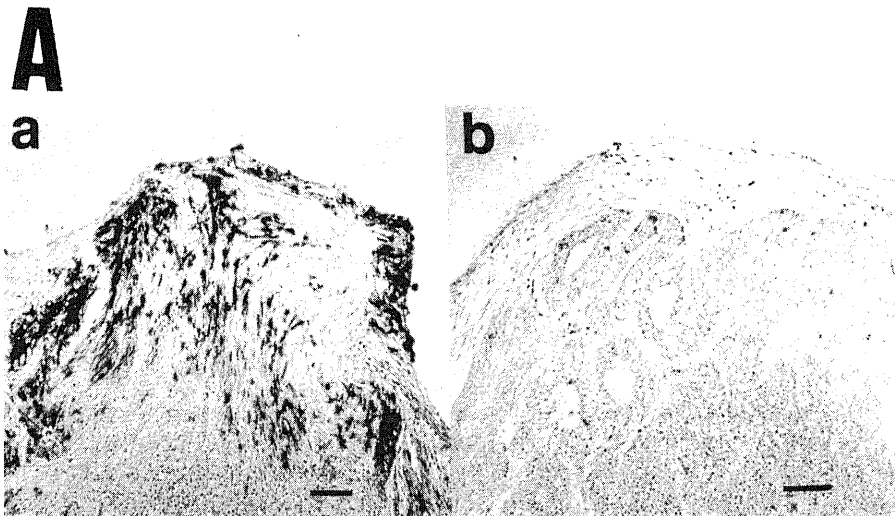


Fig. 10

4,000ルクスの蛍光灯下で培養し、一方は、アルミホイルで完全に遮光して培養した。4日後にそれぞれの松果体の visinin 陽性細胞を免疫組織化学的に調べると、明条件下では、暗条件下に比べて数倍陽性細胞が増加していた (図 10A)。また、同じような条件下にニワトリをおき、松果体の visinin 発現量をドットプロットで調べると明条件下では約3倍 visinin 蛋白質の発現が増加していた (図 10B)。以上のことより、visinin は、松果体において、直接の光受容に何らかの形で関与しており、光刺激が数日間続くと visinin の

発現自体も増加してくると考えられた。また、網膜と同じ visinin が松果体で発現しているかどうかを調べるために、ニワトリ網膜と松果体より poly (A)⁺ RNA を抽出し、Northern ハイブリダイゼーションを行ったところ、網膜と松果体ではほぼ同じ長さの mRNA が発現していることがわかった (図 10C)。

考 察

ある蛋白質の mRNA に対応する cDNA をクローニングするためには、蛋白質から一部のアミノ酸配列

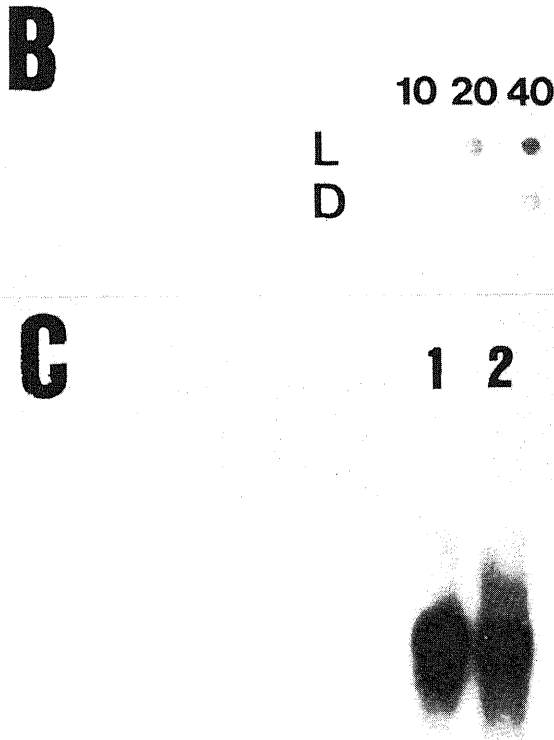


Fig.10. Visinin in the pineal body. (A) Immunohistochemistry with visinin of the pineal glands cultured under light or dark conditions. The pineal glands from hatched chicks were cultured under the continuous illumination of 4,000 lux (a) or in continuous darkness (b) for four days. (B) Dot blot of visinin protein in the pineal glands. The hatched chickens were kept in the light (L) and the dark (D) for three days and the total proteins of the pineals were blotted onto a nitrocellulose filter at 10, 20, 40 μ g protein concentrations in each row. (C) Northern blot hybridization. Poly (A)⁺ RNA from chick retinas (lane 1, 1 μ g) and pineal glands (lane 2, 10 μ g) were denatured, separated on a 1% agarose gel, and transferred to a nylon filter. The filter was hybridized with nick-translated EcoR I fragment and washed with $\times 0.1$ SSC and 0.1% sarkosyl at 65°C.

を決定し、それに対応するオリゴヌクレオチドプローブを合成し、cDNA ライブラリーをスクリーニングするのが一般的である。残念ながら、visinin のN末端のアミノ酸配列を決定することができなかったため、 λ gt11 にニワトリ網膜 mRNA の cDNA を挿入し、 β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質として発現させ、それを抗 visinin 血清でスクリーニングするという方法を用いた。先述のように抗 visinin 血清を用いた免疫組織化学的研究より、この血清中には、カルビンジンと反応する抗体が含まれていることがわかっていたので、あらかじめラットの腎臓の可溶性画分で吸収した抗体を用いてスクリーニングを行った。約 2×10^6 個のライブラリーから、1種類の陽性クローンが得られた。得られたクローンが、網膜の錐体細胞だけに発現しており、24kDa の蛋白質をコードしていることが、Northern ハイブリダイゼーション、in situ ハイブリダイゼーションおよびエピトープ選択法で精製した visinin 抗体を用いた Western ブロットティング、および免疫組織化学で確かめられた。網膜以外では、松果体で発現していることが、Northern ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学で明らかとなった。

発生学的には、鳥類では松果体の光受容構造は、より下等な爬虫類、両生類、円口類などに比べてかなり退化していると考えられているが、セロトニン-N-アセチルトランスフェラーゼ活性が日内変動することより^{30,31}、まだ直接光を認識する能力があると言われていた。実際、松果体には、オプシン様物質、オプシンキナーゼなど網膜光受容細胞だけにみられる物質も発現している^{32,33}。また、カルビンジンも松果体に存在している³⁴。

培養松果体に光をあて続けると visinin 陽性細胞が増えることから、直接光を感じる能力が松果体に残っていると考えられた。網膜では visinin の光による誘導がはっきりしなかったが、これは、ふ卵時にすでに多量の visinin が発現しているため、光により多少増加しても有意な差として検出できないためと考えられる。網膜での visinin の光による誘導をみるためには、もっと早期(ニワトリ胚)の網膜を培養する必要があると考えられる。また、最近 Korenbrot らはオプシン mRNA の日内変動と光による誘導を報告している³⁵が、visinin に関しても日内変動を調べたが、有意な変化は認められなかった。これは、visinin が細胞質内の蛋白質であるのに対し、オプシンが膜蛋白質で直接光を受ける物質であるため、その mRNA の発現量が光により、大きく変化するためかもしれない。

Visinin は、アミノ酸の一次構造および免疫組織化

学より、錐体細胞に存在するカルシウム結合蛋白質であることが明らかとなったが、実際、visinin がカルシウムイオンと結合することを示すためには visinin 蛋白質を精製するか、あるいは融合蛋白質を用いて Ca^{++} との結合実験をする必要がある。網膜には、その他のカルシウム結合蛋白質としてカルビンジンが存在することが報告されている。カルビンジンは、他に小腸、腎臓、小脳のプルキニエ細胞にも多く含まれているが、各臓器での機能は明らかになっていない。またカルレチニン (calretinin) と呼ばれるカルシウム結合蛋白質も網膜に存在することが報告されている³⁶。カルレチニンは、カルビンジンとのアミノ酸の相同性が高く (~58%)、網膜ではすべての細胞層にみられる。カルレチニンの機能も現在のところ不明である。

細胞内において、カルシウム結合蛋白質の機能は大きく分けて二つ考えられる。一つは、カルモジュリンなどの例に見られるように、カルシウムと結合することにより、他の酵素や蛋白質の機能を調節するもの、もう一つはビタミンD依存性カルシウム結合蛋白質(カルビンジンやカルレチニン)のように細胞内カルシウムの保持、輸送、緩衝作用である。Visinin はビタミンD依存性カルシウム結合蛋白質とはホモロジーは少なく、カルモジュリン、トロポニンCとホモロジーが強いことから、視細胞において、カルシウムを介して何らかの蛋白質の機能を調節している可能性が推定される。

Visinin は、アミノ酸配列よりカルシウムを結合することが予想されたが、光受容細胞にのみ存在することから、光受容に関与する、より特殊化された機能が考えられる。実際、ふ卵直後のニワトリ松果体で、光により visinin の発現が、3倍増加することから、光応答にこのカルシウム結合蛋白質が何らかの形で関与している可能性が高いと推定される。光受容と Ca^{++} の関係について、Matthews ら³⁷ や Nakatani ら³⁸ は、 Ca^{++} がフィードバック的に働き、桿体及び錐体細胞の明順応機構に関与していることを示した。また Koch ら³⁹ は微量の Ca イオンが視細胞外節のグアニル酸シクラーゼを抑制することを示した。これらのことから、Pugh ら⁴⁰ は、光受容により、cGMP 依存性チャンネルが閉じると、細胞内の Na^+ および Ca^{++} 濃度が減少し、カルシウム結合蛋白質 (M) から Ca^{++} が遊離する。この Ca^{++} 非結合のM蛋白質が、グアニル酸シクラーゼを活性化し、その結果 cGMP 量が増加し、cGMP 依存性チャンネルが再び開き、明順応状態になるという仮説を出した。もしこの仮説に visinin が関与しているならば、visinin とM蛋白質との関係

に興味を持たれる。

結 論

ニワトリ網膜錐体細胞に特異的に存在する 24kDa の蛋白質 visinin の機能を解明する目的で, visinin cDNA のクローニングを行い, 以下の結論を得た。

1. ニワトリ網膜 λ gt11 ライブラリーを, 抗 visinin 血清を用いてスクリーニングを行い, 一種類の陽性クローン (λ vis4) を得た。

2. λ vis4 を大腸菌 Y1089 に溶原化し, IPTG で β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質を誘導し, visinin 抗体で Western ブロッキングを行なったところ, 融合蛋白質のみが反応した。

3. エピトープ選択法で visinin に対する純粋な抗体を作製し, ニワトリ各組織からの蛋白質の Western ブロッキングを行なうと, 網膜の 24kDa 蛋白質のみが反応した。また, この抗体を使い, 免疫組織化学を行なうと, 網膜の錐体細胞及び松果体に染色が認められたが, 小脳や腎臓にはみられなかった。

4. Visinin cDNA をプローブにして, Northern ハイブリダイゼーションを行なうと, 網膜の約 12S (約 1,000ヌクレオチド) の mRNA とのみハイブリダイズし, 他の組織 (脳, 肝, 心, 腸および腎) とは反応しなかった。

5. Visinin cDNA をプローブにして, 網膜の in situ ハイブリダイゼーションを行なうと, 視細胞内節〜外顆粒層にかけてグレインが多数認められた。

6. Visinin cDNA プローブを用いての Southern プロット解析から, visinin 遺伝子が, ニワトリゲノム中に単一コピーとして含まれていることが示された。

7. Visinin cDNA の塩基配列決定より, visinin が, 192個のアミノ酸からなる分子量22,452ダルトンの蛋白質をコードしていることが明らかとなった。

8. 推定蛋白質のアミノ酸配列より, visinin がカルモジュリンやトロポニンCと相同性があり, 少なくとも2個の E-F ハンドを持つカルシウム結合蛋白質であると予想された。しかし, カルビンジンとの有意な相同性は認められなかった。

9. Visinin は松果体にも発現しており, 培養松果体に光を当て続けると暗所で培養した場合に比べて visinin 陽性細胞が増加した。また, 同じような条件下においたニワトリ松果体の visinin 量をドットプロットで調べると, 約3倍増加していた。また, 松果体に発現している visinin mRNA は, 網膜とほぼ同じであることが Northern プロットで確かめられた。

10. 以上の結果より, visinin は, 網膜光受容細胞お

よび松果体に存在するカルシウム結合蛋白質で, 光により誘導されることから, 錐体細胞ではカルシウムを介する光変換に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導, 御校閲を賜った三木直正教授に心から謝意を表します。また, 実験に御協力を賜った金沢大学第一解剖学教室後藤薫先生, 近藤尚武教授に心から感謝いたします。さらに, ニワトリ網膜 cDNA ライブラリーをいただいた京都大学生物物理学教室深田吉孝先生, また有益な御討論をいただいた, がん研究所薬理部郭哲輝先生, 金沢大学医療技術短期大学部中島廣志助教授ならびに金沢大学がん研究所の皆様へ深く感謝いたします。

文 献

- 1) Stryer, L.: Cyclic GMP cascade of vision. *Ann. Rev. Neurosci.*, **9**, 87-119 (1986).
- 2) Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S. & Lyubarsky, A. L.: Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature*, **313**, 310-313 (1985).
- 3) Nathans, J. & Hogness, D. S.: Isolation, sequence analysis and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell*, **34**, 807-814 (1983).
- 4) Nathans, J. & Hogness, D. S.: Isolation, and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 4851-4855 (1984).
- 5) Kuo, C-H., Yamagata, K., Moyzis, R. K., Bitensky, M. W. & Miki, N.: Multiple opsin mRNA species in bovine retina. *Mol. Brain Res.*, **1**, 251-260 (1986).
- 6) Medynski, D. C., Sullivan, K., Smith, D., VanDop, C., Chang, F-H., Fung, B. K., Seeburg, P. H. & Bourne, H. R.: Amino acid sequence of the α -subunit of transducin deduced from the cDNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 4311-4315 (1985).
- 7) Sugimoto, K., Nukada, T., Tanabe, T., Takahashi, H., Noda, M., Minamino, N., Kangawa, K., Matuo, H., Hirose, T., Inayama, S. & Numa, S.: Primary structure of the β -subunit of bovine transducin deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.*, **191**, 235-240 (1985).
- 8) Yatsunami, K., Pandya, V., Oprian, D. D.

- & Khorana, H. G.: cDNA-derived amino acid sequence of the γ -subunit of GTPase from bovine rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 1936-1940 (1985).
- 9) Ovchinnikov, Y. A., Gubanov, V. V., Khramtsov, N. V., Ischenko, K. A., Zagranichny, V. E., Muradov, K. G., Shuvaeva, T. M. & Lipkin, V. M.: Cyclic GMP phosphodiesterase from bovine retina: Amino acid sequence of the α -subunit and nucleotide sequence of the corresponding cDNA. *FEBS Lett.*, **223**, 169-173 (1987).
- 10) Ovchinnikov, Y. A., Lipkin, V. M., Kumarev, V. P., Gubanov, V. V., Khramtsov, N. V., Ashmedov, N. V., Zagranichny, V. E. & Muradov, K. G.: Cyclic GMP phosphodiesterase from cattle retina: Amino acid sequence of the γ -subunit and nucleotide sequence of the corresponding cDNA. *FEBS Lett.*, **204**, 288-292 (1986).
- 11) Nathans, J., Thomas, D. & Hogness, D. S.: Molecular genetics of human color vision: The genes encoding blue, green, and red pigments. *Science*, **232**, 193-202 (1986).
- 12) Nathans, J., Piantanida, T. P., Eddy, R. L., Shows, T. B. & Hogness, D. S.: Molecular genetics of inherited variation in human color vision. *Science*, **232**, 203-210 (1986).
- 13) Wistow, G. J., Katial, A., Craft, C. & Shinohara, T.: Sequence analysis of bovine retinal S-antigen: Relationships with transducin and G-protein. *FEBS Lett.*, **196**, 23-28 (1986).
- 14) Hatakenaka, S., Kuo, C-H. & Miki, N.: Analysis of a distinctive protein in chick retina during development. *Dev. Brain Res.*, **10**, 155-163 (1983).
- 15) Hatakenaka, S., Kiyama, H., Tohyama, M. & Miki, N.: Immunohistochemical localization of chick retinal 24K dalton protein (visinin) in various vertebrate retina. *Brain Res.*, **331**, 209-215 (1985).
- 16) Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sucroses enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**, 5294-5299 (1979).
- 17) Aviv, H. & Leder, P.: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidilic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**, 1408-1412 (1972).
- 18) Huynh, T. V., Young, R. A. & Davis, R. W.: Constructing and screening cDNA libraries in λ gt11. In D. Glover (ed.), *DNA Cloning Techniques: A Practical Approach*, 1st ed., p49-78, IRL Press, Oxford, 1984.
- 19) Gubler, U. & Hoffman, B. J.: A simple and very effective method for generating cDNA libraries. *Gene*, **25**, 263-269 (1983).
- 20) Blin, N. & Stafford, D. W.: A general method of isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucl. Acids Res.*, **3**, 2303-2308 (1976).
- 21) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 22) Benton, W. D. & Davis, R. W.: Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science*, **196**, 180-182 (1977).
- 23) Weinberger, C., Hollenberg, S. M., Ong, E. S., Harmon, J. M., Brower, S. T., Cidlowski, J., Thomson, E. B., Rosenfeld, M. G. & Evans, R. M.: Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA by epitope selection. *Science*, **228**, 740-742 (1985).
- 24) Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 4350-4354 (1979).
- 25) Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 5463-5467 (1977).
- 26) Messing, J.: New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.*, **101**, 20-78 (1983).
- 27) Sternberger, L. A.: *Immunocytochemistry*, 2nd ed., p104-169, John Wiley & Sons Inc., New York, 1979.
- 28) Yoshida, S., Kiyama, H., Tohyama, M., Hatakenaka, S. & Miki, N.: Ontogeny of visinin-like immunoreactive structure in the rat cerebellum and vestibular nuclei. *Dev. Brain Res.*, **22**, 247-253 (1985).

- 29) **Pasteels, B., Miki, N., Hatakenaka, S. & Pochet, P.**: Immunohistochemical cross-reactivity and electrophoretic comigration between calbindin D-27kDa and visinin. *Brain Res.*, **412**, 107-113 (1987).
- 30) **Deguchi, T.**: A circadian oscillator in cultured cells of chicken pineal gland. *Nature*, **282**, 94-96 (1979).
- 31) **Deguchi, T.**: Circadian activity in organ culture of chicken pineal gland. *Science*, **203**, 1245-1247 (1979).
- 32) **Kuo, C-H., Tamotsu, S., Morita, T., Shinozawa, T., Akiyama, M. & Miki, N.**: Presence of retina-specific proteins in the lamprey pineal complex. *Brain Res.*, **442**, 147-151 (1987).
- 33) **Somers, R. L. & Klein, D. C.**: Rhodopsin kinase activity in the mammalian pineal gland and other tissues. *Science*, **226**, 182-184 (1984).
- 34) **Roman, A., Brisson, P., Pasteels, B., Demol, S., Pochet, P. & Collin, J. P.**: Pineal-retinal molecular relationships: immunocytochemical evidence of calbindin-27kDa in pineal transducers. *Brain Res.*, **442**, 33-42 (1988).
- 35) **Korenbrodt, J. I. & Fernald, R. D.**: Circadian rhythm and light regulate opsin mRNA in rod photoreceptors. *Nature*, **337**, 454-457 (1989).
- 36) **Rogers, J. H.**: Calretinin: A gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J. Cell Biol.*, **105**, 1343-1353 (1987).
- 37) **Matthews, H. R., Murphy, R. L. M., Fain, G. L. & Lamb, T. D.**: Photoreceptor light adaptation is mediated by cytoplasmic calcium concentration. *Nature*, **334**, 67-69 (1988).
- 38) **Nakatani, K. & Yau, K-W.**: Calcium and light adaptation in retinal rods and cones. *Nature*, **334**, 69-71 (1988).
- 39) **Koch, K-W. & Stryer, L.**: Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. *Nature*, **334**, 64-66 (1988).
- 40) **Pugh, E. & Altman, J.**: A role for calcium in adaptation. *Nature*, **334**, 16-17 (1988).

cDNA Cloning and Characterization of Photoreceptor-specific Protein Visinin
 Kanato Yamagata, Department of Pharmacology, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **98**, 658—673 (1989)

Key words photoreceptor cells, cDNA cloning, calcium-binding, phototransduction, visinin

Abstract

Visinin is a photoreceptor (cone cell)-specific protein (molecular weight 24,000, pI 5.5) which appears in the retina at the 14th day chick embryo and gradually increases with embryonic age. In order to investigate the function of visinin, the visinin cDNA was isolated from a chick retinal λ gt11 cDNA library, by using anti-visinin serum. About 200,000 clones were screened and four positive clones which contained the same cDNA insert were obtained. One of these positive phages (λ vis4) was lysogenized into Y1089. When the β -galactosidase-visinin fusion protein induced by isopropyl β -D-thiogalactopyranoside was reacted with anti-visinin serum, only the fusion protein was detected on Western blot analysis. The fusion protein was also used for purifying epitope-selected anti-visinin antibody. The purified visinin antibody reacted only with a retinal 24kDa protein (visinin) on Western blotting and stained the inner segments of chick retinal photoreceptor cells in immunohistochemistry. In Northern blot analysis, visinin mRNA was expressed only in the retina. The size of the mRNA was about 1,000 nucleotides. In *in situ* hybridization experiment, visinin mRNA was mostly distributed in the inner segments and outer nuclear layer of the retina. The full-length of visinin cDNA (λ vis24) was

isolated from another cDNA library. The nucleotide sequence of visinin cDNA implied that visinin has at least two E-F hand structures and is a calcium-binding protein. Visinin was also found to be expressed in the pineal body. When the pineal glands from hatched chickens were cultured under about 4,000 lux light for four days, the visinin-positive pinealocytes significantly increased as compared to those in darkness. These results suggest that visinin is a photoreceptor-specific calcium-binding protein and is related to the phototransduction mechanism in the cone cells.