

# フナ網膜の錐体視物質

金沢大学医学部眼科学講座(主任 倉知与志教授)

吉 村 卓 也

(昭和44年1月27日受付)

(倉知教授就任25周年祝賀記念論文)

各種動物の網膜の感光性および感光物質に関する実験は数多く行なわれており、最近では *microelectrophotometry* の開発などによりかなり進んだ知見を得ている。とくに杆体視物質に関する報告は、その吸収スペクトル測定により各種動物網膜あるいは種々の条件下において行なわれ、かなり解明された感がある。この方面において Wald をはじめ多数の研究者が全網膜よりの抽出液の感光性に関して実験を行ない、その光照前後の吸収スペクトルの変化により感光物質の追求を行なった結果、現在の段階においては *rhodopsin*, *porphyropsin* の二種の感光物質が証明されている。牛網膜等より証明される *rhodopsin* は  $500\text{ m}\mu$  に極大吸収を有し、種々の淡水魚より抽出される *porphyropsin* は  $522\text{ m}\mu$  に極大吸収を示す。一方 Wald ら<sup>1)</sup>はこれら網膜の抽出液よりさらに石油エーテルにて抽出を行ない、クロロホルム溶液にてその吸収スペクトル測定を行ない *rhodopsin* では *vitamin A<sub>1</sub>*, *porphyropsin* に於いては *vitamin A<sub>2</sub>* を証明し、更に進んでその各々の *aldehyde* である *retinene<sub>1</sub>* および *retinene<sub>2</sub>* の蛋白質に結合したものが杆体視物質であることを証明したのである<sup>2)3)</sup>。次で Wald ら<sup>4)</sup>は錐体視物質に関しても同様の構成を想定したのである。すなわち錐体網膜である鶏網膜より  $560\text{ m}\mu$  に極大吸収を有する錐体視物質を証明し、*iodopsin* と名付け、これは *retinene<sub>1</sub>* と錐体特有の蛋白 *cone-opsin* との結合物よりなるとし、各々の錐体の持つ油球を *color-filter* の役割をなすものと考えたのである。

ここで今回私はフナ網膜を用いての錐体視物質の追求を考え、まずその感光性に関する実験を行なった。フナ網膜は混合網膜で錐体視物質の研究には不向きであり本来ならば *v. Studnitz*<sup>5)</sup> の用いたような油球のない蛇網膜を使用すれば理想的であるが、蛇、亀等は

大量に入手するのは困難であるので比較的容易に入手でき、しかもその錐体に油球を有しないフナ網膜<sup>6)</sup>を使用したのである。先にものべたように錐体視物質は *retinene* と *cone-opsin* の結合物により構成されるとする Wald の想定であるが、色覚に関する錐体の *chromophore* が *retinene* のみであり、錐体視物質の相違が単に *retinene* に結合する *opsin* のみの相違によると断定するのは少々困難なようである。一般に淡水魚における網膜の感光性に関しては *porphyropsin* の他に *retinene<sub>2</sub>* と鶏網膜の *opsin* とより *cyanopsin*<sup>7)</sup> ( $\lambda_{\text{max}}; 620\text{ m}\mu$ ) を合成し、これが淡水魚の錐体視物質であると報告されている。しかし *cyanopsin* は生網膜より抽出されたものではない。

以下私はフナ網膜を使用し、全網膜抽出液と細胞内粒子抽出液についてその感光性に関する実験を行ない *porphyropsin* 以外に錐体視物質によると考えられる吸収スペクトルの成績を得たので報告を行なう。

## 実験材料、実験方法および実験成績

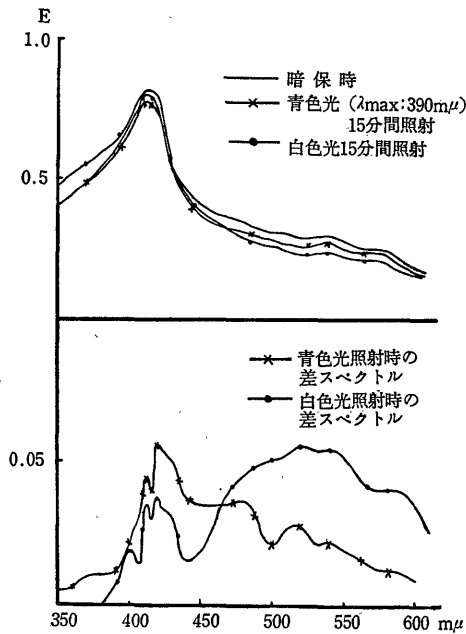
### I. 全網膜抽出液の感光性

約30尾のフナ (*Carassius carassius L.*, 一匹約  $20\text{ cm}$ ,  $150\text{ gr}$ ) を水槽に入れたまま 3~5時間暗順応した後、微赤光下(東芝製赤色電球を用い  $1\text{ m}$  離れて照度は  $1\text{ Lux}$  以下)で網膜を剥離する。約60枚の剥離網膜を  $\text{pH } 7.2\sim 7.4$  に調製した氷冷  $2\%$  デソキシ胆汁酸ソーダ溶液  $5\text{ ml}$  中に集め、次で *Potter-Elvehjem* 型のガラス製 *homogenizer* を用いて *homogenize* する。氷冷で6時間時々攪拌しながら暗中で抽出する。視紅や視紫の場合は普通室温程度で抽出するのであるが、錐体視物質の場合は分解する恐れがあるために氷冷で比較的短時間の抽出を行なった。冷却遠心器(佐久間製作所製、超高速遠心機  $50\text{ V-S}$ , 真空冷却型)を用いて  $25,000\times\text{G}$  で30分間冷却遠心

Cone-substance of Crucian Retina. **Takuya Yoshimura**, Department of Ophthalmology (Director: Prof. Y. Kurachi), School of Medicine, Kanazawa University.

し、上清を分離する。その上清はうすい赤紫色を呈する。この上清を適当に稀釈したのち、分光光度計（島津製作所製、Beckman 型）で吸収スペクトルを測定した。測定後キュベットを 390 m $\mu$  附近の波長を透過せしめる東芝製青色フィルター（V-V<sub>1</sub>）を通して 500W のプロジェクターで15分間照射する。最初青色フィルターで照射するのは初めから白色光で照射する場合 porphyropsin の分解による吸収のために他の感光物質がかくされるのを恐れたためである。青色光照射後吸収スペクトルを測定し、その後さらにキュベットをフィルターを用いず白色光で15分間照射する。その後3度目の吸収スペクトル測定を行なった。（図1の上）

図1 全網膜抽出液の感光性



青色光照射時および白色光照射時のそれぞれの暗保時とのスペクトルの差を取ると図1の下の方の如く青色光照射時の場合 420 m $\mu$  と 414 m $\mu$  に双峰性の山と 480 m $\mu$  附近と 520 m $\mu$  附近に隆起のある差スペクトルが得られる。白色光照射の場合 520~540 m $\mu$  の隆起が大きくなり、それより短波長側では同じく 420 m $\mu$  と 414 m $\mu$  の双峰性の山と 400 m $\mu$  に小さな隆起が認められる。

この成績ではどちらにも 520 m $\mu$  附近の porphyropsin によると考えられるものが認められる。また 420 m $\mu$  附近にはとくに青色光照射の場合に著明であるが、porphyropsin 以外の感光物質が存在すること

が推定できる。

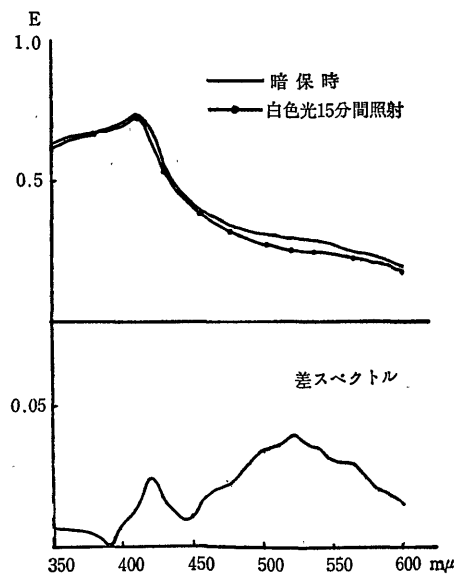
次で微青光下において全網膜より前記同様の操作にて抽出を行ない、白色光照射後吸収スペクトル測定を行ない暗保時のそれと比較してみた。Wald は 620 m $\mu$  に極大吸収を有する cyanopsin は vitamin A<sub>2</sub> あるいは retinene<sub>2</sub> と cone-opsin の存在する網膜においてすべて成立し得るだろうと考えているが、cyanopsin は今迄生網膜より証明されたことは無く、cis-retinene<sub>2</sub> と鶏網膜の杆錐体抽出液とを incubate して合成されたものである。この cyanopsin の存在を確かめるために上記の微青光下での実験を行なったのであるが、620 m $\mu$  附近には差スペクトルは認めなかった。

II. 網膜の細胞内粒子抽出液の感光性

先の実験は全網膜からの抽出液によるものであり、少量の脈絡膜色素の混在を否定できないので次に網膜の細胞内粒子からの抽出液による実験を試みた。この理由はさき秋谷<sup>9)</sup>が指摘したように視物質は視細胞外節のマクロゾームと粒子に結合して存在するものが視覚形成に関与するという考えからであり、また脈絡膜の油球などによる汚染を排除できると考えたためである。実験方法および結果は以下の如くである。

3~5 時間の暗順応の後微赤光下で網膜を剥離し、その湿重量の約10倍量の 0.25 M sucrose を用いて氷冷中で homogenize し、600×G で10分間冷却遠心する。核や神経線維や血管組織を除去した上清を 25,000×G で1時間冷却遠心分離し細胞内粒子を得

図2 網膜細胞内粒子抽出液の感光性



る。それより〔I〕と全く同様に2%デオキシ胆汁酸ソーダで抽出する。暗保時の吸収スペクトル測定を行ない、次で500W プロジェクターで15分間光照した後に再度吸収スペクトル測定を行なう。以上の操作はすべて微赤光下に行なった。光照前後の吸収スペクトルおよびその差スペクトルを図2に示す。

吸収極大の位置は520 m $\mu$  と 420 m $\mu$  附近にあって、前者はややなだらかな山形を形成し後者はより急峻な山形の曲線を形成する。この成績は〔I〕の全網膜抽出液による実験結果と同様に520 m $\mu$  附近に極大吸収を示す porphyropsin の存在と同時に420 m $\mu$  附近に porphyropsin 以外の視物質が存在することを推定せしめる。次で〔I〕と同様に全操作を微青光下にて行ない吸収スペクトル測定を行なったが620 m $\mu$  の cyanopsin を示す差スペクトルは認められなかった。

### 総括および考察

魚類とくに淡水魚の感光物質に関しては現在の所、rhodopsin に対応するものとして522 m $\mu$  に吸収極大を示す porphyropsin<sup>9)</sup> が普通に認められている。一般に感光物質の研究を行なう場合、暗順応した実験動物より網膜をとり出し、ジギトニン水あるいは deoxycholate 水中に抽出し曝光前後の吸収スペクトル測定により感光物質を追求するのであるが、その際抽出時間とか温度、pH、照射光の種類、照射時間などの実験条件の相違により結果はかなり異なる。感光物質は光により勿論すぐ変化を生ずるが他に温度の上昇あるいは酵素による分解にも影響を受け易く、報告者によって結果は必ずしも一致していない。そこでそれらの概略を記載し本実験の成績と比較検討したい。

1896年に Kottgen<sup>10)</sup> はスズキ、マス等より540 m $\mu$  に極大吸収を示す visual purple を報告している。1936年 Bayliss<sup>11)</sup> は10数種の海水魚につき2~12時間の暗順応後微赤光下で網膜を剝離し、生理的食塩水にて処理し、さらに2%ジギトニン水にて抽出後遠心し、その上清についての光照前後の吸収スペクトルより次のような結果を得ている。サバ505 m $\mu$ 、カレイ530 m $\mu$ 、ホウボウ545 m $\mu$  に吸収極大を示し、その他サメ、ウナギなどいずれも505~545 m $\mu$  の範囲内に吸収極大が存在することを報告し、これを個々の visual purple としている。抽出に際してのpH、時間に付いての記載は無い。1950~52年 Dartnall<sup>12)13)</sup> はフナ (tench) を使用して以下の実験を行なった。剝離網膜を pH 4.6 の緩衝液で処理して2%ジギトニンで5分間抽出し4000 r.p.m で20分間遠

心分離して上清を得、これにつき氏はまず600~650 m $\mu$  の単色光で数時間室温で光照して  $\lambda_{max}$  ; 533 $\pm$ 2 m $\mu$  の差スペクトルを得て visual violet (red sensitive pigment) であるとした。また同様に白色あるいは緑色光で照射したもので467 m $\mu$  に吸収極大を有する red insensitive pigment を得て visual pigment 467 と命名している。1953年 Kampa<sup>14)</sup> はフナ、マス、カエルなどで2~16時間の暗順応後微赤光下 (120 W lamp, Wratten 2 red filter) で網膜を氷冷生理的食塩水中に取り出し、2%ジギトニン又は4% sodium deoxycholate 中に抽出、暗中25°Cで1時間放置後フィルターでこして24時間0°Cで保存する。その後3,000~12,000 r.p.m で15~45分間遠心分離しその上清について暗保と10分間100Wの光源で光照後の差をとると520 m $\mu$  に吸収極大を示す曲線を得た。一方 Wald<sup>15)</sup> は1936年から続く一連の実験において次のような結果を報告している。

Wald は種々の魚について微赤光下で網膜を剝離し3時間4% alum に入れて水洗後 phosphate buffer solution で中性にした。次に2%ジギトニン中に一晚放置して抽出し、その後3,000 r.p.m で20分間遠心分離、その上清を2°Cに保存する。このジギトニン抽出液について光照前後の吸収スペクトルより差スペクトルを算出しこの曲線が522 $\pm$ 2 m $\mu$  に吸収極大を持つことを示し、この感光物質を porphyropsin と命名した。そしてこの porphyropsin は rhodopsin に対応する淡水魚の visual pigment であると推論している<sup>16)</sup>。また1953年 Wald<sup>17)</sup> は鶏の cone-opsin と cis-retinene<sub>2</sub> とから青色の620 m $\mu$  に  $\lambda_{max}$  を示す感光物質を合成し cyanopsin と名付けた。cyanopsin は生網膜より抽出されたのではないが vitamin A<sub>2</sub> または retinene<sub>2</sub> と cone-opsin を含むいかなる網膜においても成立つことを期待できるとしている。

以上魚類の感光物質に関する知見の概略を述べたが、以下本実験の成績と比較し考按を加えたいと思う。

網膜抽出液の光照前後の差スペクトルについて520 m $\mu$  附近と420 m $\mu$  附近の2カ所に吸収極大を認めた。520 m $\mu$  の吸収は前記研究者の成績を照し合わせて、Wald の命名した porphyropsin に一致する。また cyanopsin に関して微青光下において検したが620 m $\mu$  附近に差スペクトルは認めなかった。次に420 m $\mu$  の吸収については現在迄に報告は無い。ただそれに近いものとして淡水魚の錐体視物質に関して単一錐体の差吸収曲線を Hanaoka<sup>17)</sup> が報告してい



において褪色する  $420\text{ m}\mu$  に  $\lambda_{\text{max}}$  を有する錐体視物質が存在することを認め、さらにこれが網膜の細胞内粒子抽出液においても証明されることは、視細胞外節の粒子の小さいマイクロゾームにおいて視物質が形成されるという考えからすれば<sup>21)</sup>、なお一層錐体視物質によるものであるという感を深めるのである。またそれとともに他の報告にこの錐体視物質の証明されなかった理由等について考按を加えた次第である。

### 結 論

1. フナ網膜のデスオキシ胆汁酸ソーダー抽出液を用いて曝光前後の吸収スペクトル測定を行ない、その差スペクトルを得た。青色光照射の場合  $420\text{ m}\mu$  附近に著明な山と  $520\text{ m}\mu$  附近に porphyropsin の吸収が認められた。白色光照射の場合は  $420\text{ m}\mu$  の吸収は減り、porphyropsin の吸収が大きくなるのを認めた。

2. 網膜の細胞内粒子より抽出を行ない白色光を照射した場合も  $420\text{ m}\mu$  に急峻な差スペクトルを認めた。

3. この  $420\text{ m}\mu$  の吸収は錐体視物質によるものであることを推論した。

稿を終るに臨み、恩師倉知与志教授ならびに秋谷鎮雄講師の御指導、御校閲を深く感謝致します。

### 文 献

1) Wald, G. & Zussman, H. : J. Biol. Chem., 122, 499 (1937-1938). 2) Hubbard, R., Gegerman, R. I. & Wald, G. : J. Gen.

Physiol., 36, 415 (1952-1953). 3) Wald, G. & Brown, P. K. : J. Biol. Chem., 222, 865 (1955). 4) Wald, G., Brown, P. K. & Smith, P. H. : J. Gen. Physiol., 38, 623 (1954-1955). 5) v. Studnitz, G. : Pflügers Arch. Physiol., 230, 614 (1932). 6) 竹内誠輔 : 日眼会誌, 63, 1129 (1959). 7) Wald, G., Brown, P. K. & Smith, P. H. : Science, 118, 505 (1953). 8) 秋谷鎮雄 : 日眼会誌, 67, 1168 (1963). 9) Wald, G. : J. Gen. Physiol., 22, 775 (1939). 10) Köttgen, E. & Abelsdorff, G. : Z. Physiol., 12, 161 (1896). 11) Bayliss, L. E., Lythgoe, R. J. & Tanslay, K. : Proc. Roy. Soc., London, Biol. Sc. B120, 95 (1936). 12) Dartnall, H. J. A. : Nature, 166, 207 (1950). 13) Dartnall, H. J. A. : J. Physiol., 116, 257 (1952). 14) Kampa, E. M. : J. Physiol. (London), 119, 400 (1953). 15) Wald, G. : Nature, 139, 1017 (1937). 16) Wald, G. : Annual Rev. Biochem., 22, 497 (1953). 17) Hanaoka, T. & Fujimoto, K. : Japan J. Physiol., 7, 276 (1957). 18) Rushton, W. A. H. : Nature, 179, 571 (1957). 19) Morton, R. A., Salah, M. K. & Stubbs, A. L. : Nature, 159, 744 (1947). 20) 吉沢 透 : 生物物理, 6, 7 (1966). 21) 倉知与志 : 日眼会誌, 67, 1241 (1963).

### Abstract

Isolated dark-adapted retinae from 30 crucians were prepared under a dim red light and they were extracted with 2% desoxycholic acid for 6 hr at  $0^{\circ}\text{C}$ , by sometimes stirring. This procedure of extraction might be able to prevent the thermal decay of unstable cone-substances. The extracts were exposed to a blue light ( $\lambda_{\text{max}}$  :  $390\text{ m}\mu$ ), then to a white light. The absorption spectra were measured before and after bleaching. Different spectrum of bleaching with blue light showed maxima at about  $520\text{ m}\mu$  (porphyropsin) and at  $420\text{ m}\mu$ . Likewise, different spectrum of bleaching with white light showed maximal peaks at about  $520\text{ m}\mu$  and  $420\text{ m}\mu$ . The absorption maximum at  $420\text{ m}\mu$  has not yet been reported.

Since we assume that the visual pigments are combined with microsome or particles in the outer-segments of visual cells, different spectrum was obtained with the extracts from the intracellular particles of crucian retinae. The different spectrum of these extracts showed two maxima at about  $522\text{ m}\mu$  (porphyropsin) and at  $420\text{ m}\mu$ . This result coincided with that obtained from the experiment with whole retinae.

The absorption maximum at  $420m\mu$  is probably due to the con-substance of the crucian retina, since the porphyropsin band is shown besides the maximum at  $420m\mu$  in the extracts from intracellular particles as well as from whole retina.

As I intended to investigate the cone-substance in this report, the extraction was performed at  $0^{\circ}\text{C}$  and within a brief period to prevent the bleaching of the cone-substance very unstable at higher temperatures, sensitive to light, dependent on pH and liable to be decomposed gradually even in the dark.

---