

マウス網膜視細胞内節リボソームの配列は光環境に依存する

大久保明子, 鮫島 宗文, 鷯木 一彦, 上原 文行, 大庭 紀雄

鹿児島大学医学部眼科学教室

要 約

一定の光周期(明:暗=12時間:12時間)で飼育した成熟マウスを対象として, 明周期と暗周期とにおける視細胞内節に存在する遊離リボソームの配列パターンを電子顕微鏡を用いて観察した。明周期では, リボソーム粒子はランダムに分布する分散型配列を示した。この場合, 配列の細部を観察すると, 数個が数珠状もしくは螺旋状に連なるものと孤立するものとが混在した。暗周期では, 数個のリボソームが寄り集まって輪状あるいはロゼット状にクラスターを形成する集簇型配列を示した。また,

27時間にわたって連続的に暗所で飼育した場合, ほとんどのリボソームは特徴ある集簇型の分布形態を示した。視細胞内節の遊離リボソームの光周期に依存した形態変化について, 蛋白質合成の活性化もしくは不活性化の側面から考察した。(日眼会誌 98:1067-1070, 1994)

キーワード: リボソーム配列, 視細胞内節, 明・暗順応, マウス

Light-dependent Changes of Ribosome Distribution in Photoreceptor Inner Segments of the Mouse Retina

Akiko Okubo, Munefumi Sameshima, Kazuhiko Unoki, Fumiyuki Uehara and Norio Ohba

Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

Abstract

We studied the distribution pattern of free ribosomes in the photoreceptor inner segments of adult mice with reference to environmental light. Eyeballs were obtained from animals at the light or dark phase of the ordinary cyclic light, and photoreceptor inner segments were examined by electron microscopy. In the light phase, free ribosomes were distributed in a random fashion, although meticulous observations revealed that they appeared to be arranged either in a spiral or linear form, or in isolation. In the dark phase, several free ribosomes were arranged in a clustered fashion. When animals

were kept in continuous darkness as long as 27 hours, most of the inner segment free ribosomes showed a clustered pattern similar to that in the dark phase of the cyclic light. We discussed the light-dependent configurational changes of ribosomes with respect to their activity or inactivity in protein synthesis. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 1067-1070, 1994)

Key words: Ribosome distribution, Photoreceptor inner segment, Light/dark adaptation, Mouse

I 緒 言

我々は先に, ラット網膜視細胞の内節に豊富に存在する遊離リボソームの配列と分布のパターンは, 光環境に依存することを報告した¹⁾。すなわち, 明周期では, 視細胞内節中の遊離リボソームは一見してランダムに分布し, 分散型と表現されるパターンを示すが, 配列の細部

をみると数個が数珠状もしくは螺旋状に連なるものと孤立するものとが混在する。他方, 暗周期では, 孤立するものもあるが, 数個がロゼット状にクラスターを作って配列して集簇型と表現される分布パターンを示す。集簇型の分布パターンは, 暗順応を長く続けると際立って優位になる。ところで, 視細胞の微細形態に関する研究成果については古くから多数の報告があるが, 文献を調べ

別刷請求先: 890 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1 鹿児島大学医学部眼科学教室 大久保明子
(平成6年5月13日受付, 平成6年7月6日改訂受理)

Reprint requests to: Akiko Okubo, M.D. Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima-shi, Kagoshima-ken 890, Japan

(Received May 13, 1994 and accepted in revised form July 6, 1994)

た限りでは、我々が見出した上述のような所見の記載は見当たらない。この新しい知見をさらに確認するために、今回はマウスを実験対象として明順応網膜、暗順応網膜における内節遊離リボソムの配列と分布パターンを検討した。

II 実験方法

8週齢の白色マウス (BALB/C) を、一定の光環境 (明:暗=12時間:12時間、午前7時~午後7時が明環境、その他の時間が暗環境) のもとで1週間飼育した。次に、明周期中 (午後2時)、暗周期中 (午後10時) に、それぞれ2匹ずつ炭酸ガスで安楽死させた。また、2匹を27時間にわたって連続的に暗所においた後、同様に処置した。暗所における麻酔およびその後の処置は、赤色光のもとで行った。ただちに、4%パラフォルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒド/0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて灌流固定した。なお、実験動物の飼養、麻酔、眼球摘出、その後の処理は、「鹿児島大学医学部実験動物に関する規則」に準拠した。

摘出眼球を上記の固定液を用いて浸潤固定した。次に、以下の手順によって光学顕微鏡観察用および電子顕微鏡観察用に試料を作成した。眼球を子午線に沿って耳側と鼻側とに2分割して、0.1M 磷酸緩衝液で洗浄した。2%オスミウム酸 (0.1M 磷酸緩衝液, pH 7.4) で固定、アルコール系列で脱水、エポキシ樹脂に包埋した。網膜について厚さ1 μ mの切片を作成、トルイジンブルーで染色した試料を光学顕微鏡で観察した。また、後極部網膜について超薄切片を作成し、酢酸ウランとクエン酸鉛で染色した試料を電子顕微鏡 (Hitachi 7000型) で観察した。

撮影倍率15,000倍、最終倍率90,000倍の電子顕微鏡写真について、視細胞内節の遊離リボソム粒子の大きさと粒子間距離とを計測した。明周期網膜と暗周期網膜における視細胞内節の遊離リボソムについて、明周期では数珠状または螺旋状の配列をとる遊離リボソムを、暗周期では集簇型の配列をとる遊離リボソムを対象とした。具体的に、リボソムの大きさについては、明周期と暗周期でそれぞれ任意に選んだ60個について最大径を計測した。そして、粒子の切断方向によって見かけの大きさは変わるので、明周期と暗周期の各群において、計測値の中から大きい方の10個を選んで直径の平均値をt検定を用いて群間比較した。リボソムの粒子間の距離については、明周期と暗周期の試料から、隣り合う粒子を任意に40組選び出して、粒子の中心間距離を計測し、粒子間距離の平均値をt検定を用いて群間比較した。

III 結果

明周期中、暗周期中および連続暗順応中で、それぞれ

2匹のマウスから得た網膜試料について、視細胞内節の遊離リボソムの配列と分布パターンを検討した結果、以下の所見がそれぞれの実験試料においてきわめて良好な再現性で観察された。

1. 明周期網膜

視細胞内節の遊離リボソムは、一見してランダムな分布を示して、分散型のパターンであった。詳しく観察すると、数珠状あるいは螺旋状に連なったようにみえる配列を示すリボソムの群、および単独のものとが混在していた (図1)。集簇型のリボソムをわずかながら含む内節も時にあった。

2. 暗周期網膜

視細胞内節の遊離リボソムは、集簇型の分布を示した。すなわち、数個のリボソムが寄り集まってロゼット状、あるいは輪状に配列しクラスターを形成するものと、単独のものとが混在した (図2)。明周期網膜で観察

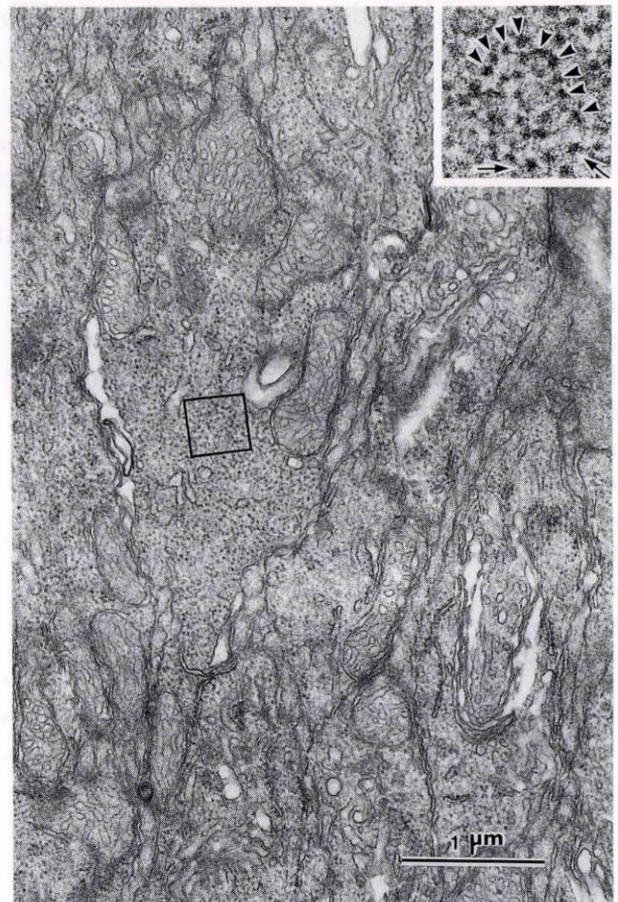


図1 明周期 (午後2時) のマウス網膜視細胞内節の電子顕微鏡写真。

内節遊離リボソムは一見するとそれぞれがランダムに存在する (分散型)。詳しく観察すると、数珠状もしくは螺旋状に連なっているとみなされるものと、単独のものとが混在する。挿入図は、このことを明示するために当該箇所を拡大したもの (楔印: 数珠状に連なっているとみなされる配列を示す。矢印: 単独のものを示す)。

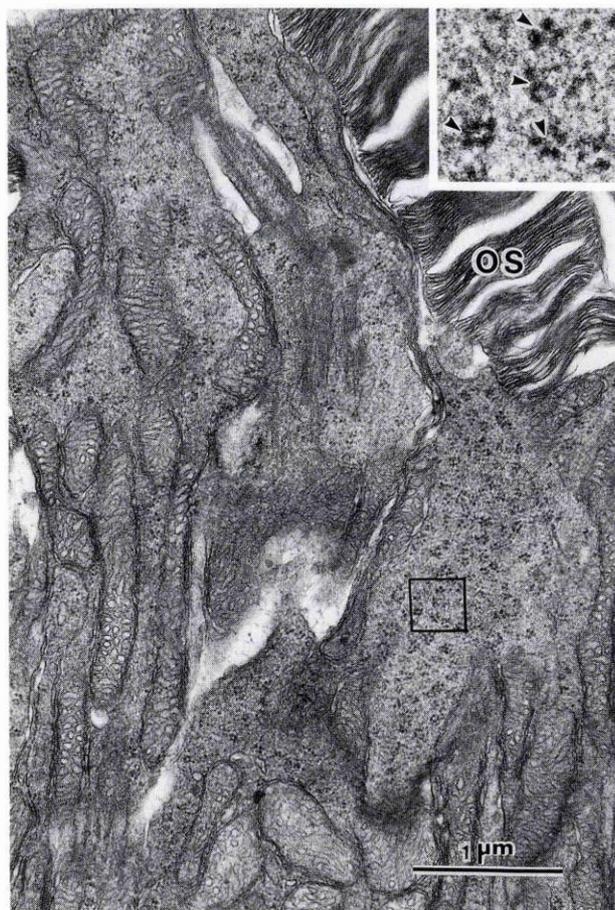


図2 暗周期(午後10時)の網膜視細胞内節。
ほとんどの遊離リボソームは、ほぼ輪状に数個ずつ寄り集まってクラスターを形成している(楔印:集簇型を示す)。挿入図は、以上を明示するための拡大写真。
OS:視細胞外節

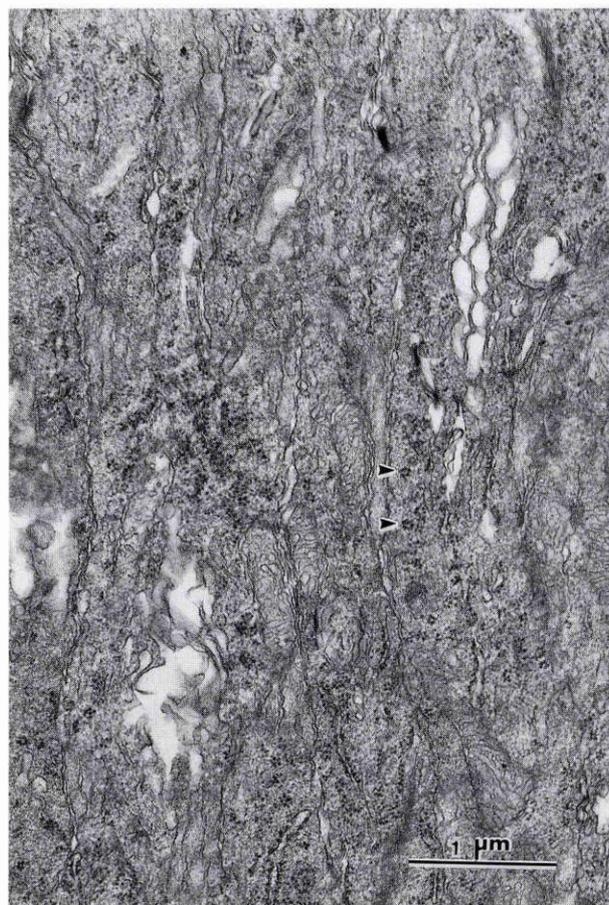


図3 27時間連続暗順応下の網膜視細胞内節。
遊離リボソームのほとんどがクラスター(楔印)を形成し、集簇型の分布を示している。

されたランダムな分布を部分的に示す内節も時にあった。

3. 連続暗順応網膜

内節遊離リボソームのほとんどは、通常の明暗周期に飼育した場合の暗周期にみられる集簇型に一致する分布を示した(図3)。

4. リボソーム粒子の計測

明周期網膜での数珠状や螺旋状とみなされる遊離リボソームの粒子の最大径は、 35.1 ± 2.5 nm (平均値 \pm 標準偏差, $n=10$), 粒子中心間の距離は 33.6 ± 5.3 nm ($n=40$) であった。暗周期網膜の集簇型リボソーム粒子の最大径は 40.3 ± 4.6 nm ($n=10$), 粒子中心間の距離は 29.7 ± 4.8 nm ($n=40$) であった。

粒子の最大径および粒子中心間の距離の上記計測値を検定すると、いずれも明周期と暗周期との間に有意な差異があった ($p < 0.01$)。

IV 考 按

今回の研究結果は、マウスの網膜においても、ラット

網膜¹⁾と同様に、視細胞内節に存在する遊離リボソームの配列および分布パターンが光環境に依存することを確認するものである。すなわち、明所ではランダムに分布する分散型パターンが優位を占め、暗所ではクラスターを形成する集簇型パターンが優位を占める、という所見である。

視細胞で産生される蛋白質の合成量や分布は、光環境依存性に変化する²⁾⁻⁵⁾。蛋白質合成の場であるリボソームの分布パターンの明所と暗所における差異は、蛋白質合成の動的変化に対応すると考えられる。一般に、1本の mRNA に多数のリボソームが結合して緊密に集合したポリソームは、蛋白質合成が活発な場合に観察されるといわれている⁶⁾⁷⁾。一方、緊密な集合形態をとるポリソームは、むしろ蛋白質合成を停止した不活性状態であるという見解⁸⁾⁹⁾もある。マウスやラットの暗所における網膜で優勢に観察されるロゼット状、あるいは輪状に集簇して配列するリボソーム群は、活性型のポリソームか不活性型のポリソームのどちらかであろう。ラットにおいては、集簇型のリボソームは、蛋白質合成が低下すると考えられる長期暗順応や持続的光照射による変性の初期に観察される¹⁾。今回のマウスでの実験においても、生

理的な暗周期のみならず、暗順応を長期に持続すると集簇型の分布パターンが際立って優位であった。このことは、暗周期と明周期のリボソーム粒子の形態計測の結果でも確認された。しかも、集簇型を特徴づけるクラスターの形態は、Bell ら⁸⁾が不活性型とみなしたポリソームの形態に酷似する。ちなみに、Bell らの論文に掲載された不活性型のポリソームとみなされた電子顕微鏡写真について、隣り合う粒子中心間距離を測定してみると、平均 31.9 ± 3.9 nm (平均値 \pm 標準偏差) である。ゆえに、今回の実験で観察された集簇型のリボソームは、不活性型のポリソームを表現するとみなすのが自然であろう。しかし、活性型ポリソームである可能性を全く除外することはできない。暗順応に特徴的な、集簇するリボソーム群を不活性型のポリソームとした場合、明順応でみられる、より緩やかに配列する数珠状、螺旋状のリボソーム群が、活性型のポリソームを反映するのであろう。

リボソームの大きさについては、今回の研究では分散型で 35.1 ± 2.5 nm、集簇型で 40.3 ± 4.6 nm という結果であり、いずれも一般にいられている真核生物のリボソームの平均的な数値(約 30 nm)よりも大きい値であった。切片の切り具合、計測方法などに由来する不一致かもしれない。いずれにせよ、分散型と集簇型との間にリボソームの大きさに差異をみたことは興味深い観察と思われる。上述のように、集簇する配列のリボソームを不活性の状態とみなすと、活性型ポリソームを不活性化するために、それぞれのリボソーム粒子の周囲に、何か物質が付着して大きくなっていることも予想される。

ラットおよびマウスという種をこえて、明順応、暗順応網膜で内節遊離リボソームの配列に同様の変化がみら

れたということは、この新しく見出した現象の普遍性を示唆している。

文 献

- 1) **Okubo A, Sameshima M, Uehara F, Ohba N**: Ultrastructural study of ribosomes in photoreceptor inner segments of rats reared in continuous light or continuous darkness. *Jpn J Ophthalmol* (印刷中), 1994.
- 2) **Korenbrodt JI, Fernald RD**: Circadian rhythm and light regulate opsin mRNA in rod photoreceptors. *Nature* 337: 454—457, 1989.
- 3) **Brann M, Cohen LV**: Diurnal expression of transducin mRNA and translocation of transducin in rat retina. *Science* 235: 585—587, 1987.
- 4) **Uehara F, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM**: Light-evoked changes in the interphotoreceptor matrix. *Science* 248: 1633—1636, 1990.
- 5) **Yanagita T, Uehara F, Nakashima Y, Ozawa M, Muramatsu T, Ohba N**: Demonstration of peripherin/rds mRNA in normal and light-damaged rat retinas by in situ hybridization histochemistry. *Jpn J Ophthalmol* 37: 1—8, 1993.
- 6) **Slyter HS, Warner JR, Rich A, Hall CE**: The visualization of polyribosomal structure. *J Mol Biol* 7: 652—657, 1963.
- 7) **Lake LA**: The ribosome. *Science* 245: 84—97, 1981.
- 8) **Bell E, Humphreys T, Slyter HS, Hall CE**: Configuration of inactive and active polysomes of the developing down feather. *Science* 148: 1739—1741, 1965.
- 9) **Byers B**: Structure and formation of ribosome crystals in hypothermic chick embryo cells. *J Mol Biol* 26: 155—167, 1967.