

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14568

研究課題名(和文)哺乳類の進化過程で失われた眼外光受容能の解明

研究課題名(英文)Study on a non-visual photoreception lost in the course of mammalian evolution

研究代表者

小柳 光正 (Koyanagi, Mitsumasa)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：30379276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、一般的な哺乳類である真獣類には存在しない光受容タンパク質類似遺伝子が、有袋類のゲノム中に存在することを見出した。有袋類オポッサムからこの光受容タンパク質類似遺伝子をクローニングし、分光学的・生化学的手法を用いて機能解析を行った結果、この遺伝子由来のタンパク質が、確かに光受容タンパク質として機能することを明らかにした。さらに、組織学的解析によって、この光受容タンパク質が、真獣類にも存在する他の光受容タンパク質とは異なる発現プロファイルを示すことを明らかにした。これらの結果は、真獣類にはない光受容能がオポッサムに存在することを強く示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：We discovered a photoreceptor gene (opsin), which does not exist in eutherian genomes, in marsupial genomes. In this study, we carried out functional analyses of the marsupial opsin spectroscopically and biochemically to understand the diversity of photoreception in mammals. We found that the marsupial opsin indeed forms a photosensitive pigment. In addition, histochemical analysis revealed that the marsupial opsin exhibits a different expression pattern from other opsins in opossum, suggesting a novel photoreception in mammals.

研究分野：光生物学

キーワード：進化 光感覚 有袋類 生理学 ロドプシン

1. 研究開始当初の背景

光は動物にとって重要な外的刺激であり、動物は、光情報を視覚や概日リズムの同調といった視覚以外（非視覚）の光受容に用いている。これら動物の光受容を支える中心分子は、視物質・ロドプシンに類似した光受容タンパク質（オプシン）である。オプシンは、単に光をキャッチする分子であるだけでなく、その分子特性が光受容の性質と密接に関わることから、オプシンの解析は動物の光受容の研究において有効なアプローチである。大部分の脊椎動物では、眼に加え、脳や松果体といった眼外での光受容が知られているが、哺乳類では、眼外光受容の明確な報告はなく、光受容能に乏しいと考えられている。このことは、哺乳類の祖先が、夜行性に適応する過程で多数のオプシン遺伝子を失ったことと深く関連している。しかしながら最近私たちは、一般的な哺乳類である真獣類では失われているオプシン類似遺伝子（TMT2 オプシン）が、有袋類のゲノム中に残っていることを見出した（日本動物学会 2012、図 1）。

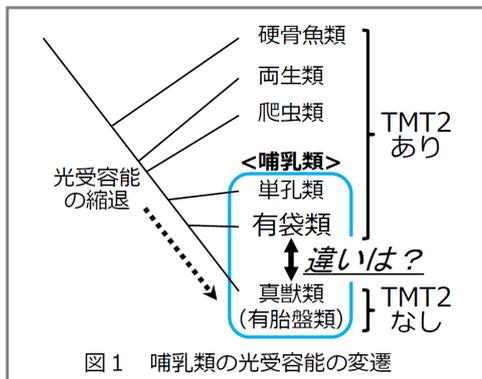


図 1 哺乳類の光受容能の変遷

TMT2 オプシンは、もともと魚類において、眼、脳、肝臓、心臓などのさまざまな組織に発現していることから Teleost multiple tissue (TMT) オプシンと名付けられたオプシンのグループで、特に TMT2 オプシンは魚類の松果体での発現が報告されている。最近私たちは、TMT2 オプシンのパラログ（魚類 TMT1 オプシン）および無脊椎動物ホモログ（ハマダラカ Opn3）の機能解析に成功し、TMT オプシン類が眼以外の組織で機能することを可能とする特徴的な分子特性を持つことを見出した【Koyanagi et al., PNAS 110, 4998-5003 (2013)】。これらの知見は、TMT2 オプシンが有袋類において未知の光受容（おそらく眼外光受容）を担っていること、すなわち有袋類は真獣類が失った光受容能をまだ保持していることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、真獣類には存在しない TMT2 オプシンが、有袋類においてどのような光受容に関わるかを理解することによって、有袋類と真獣類との間の光受容の違い、すなわち哺乳類進化の最後に失われた光受容がどの

ような生理機能に関わっていたのかを明らかにすることを目指した（図 1）。

3. 研究の方法

本研究では、TMT2 オプシンの機能解析を起点として、有袋類に存在する“真獣類が失った光受容能”の解明を目指した。具体的には、有袋類オポッサムの TMT2 オプシンを中心に、分光学的・生化学的手法を用いて光受容タンパク質としての性質を解析し、組織学的解析により TMT2 オプシン発現組織を調べた。また、TMT2 オプシンの関連光受容タンパク質および他の眼外光受容タンパク質についても同様の解析を行い、眼外光受容における TMT2 オプシンの位置づけを解析した。

4. 研究成果

(1) オポッサム TMT2 オプシンの機能解析
南米に生息する有袋類オポッサムの入手経路を確立し、生体組織および RNA の取得に成功した。オポッサムの脳由来 cDNA から TMT2 オプシン cDNA をクローニングし、培養細胞発現系を用いて TMT2 の分光学的・生化学的解析を行った。その結果、TMT2 オプシンの組換えタンパク質の生成に成功し、オポッサム TMT2 オプシンが確かに光受容タンパク質として機能することを明らかにした。さらに、改変型ルシフェラーゼを用いた細胞内二次メッセンジャーのリアルタイム計測によって、オポッサム TMT2 オプシンが、光依存的に G タンパク質を活性化することを明らかにした。これらの結果は、有袋類に残されていた TMT2 遺伝子が、偽遺伝子ではなく、機能遺伝子であることを示している。さらに、定量的 PCR によって、オポッサムにおける TMT2 オプシンの発現パターンの解析を行い、TMT2 オプシンが、真獣類にも存在する他の眼外光受容タンパク質とは異なる発現プロファイルを示すことを明らかにした。これらの結果は、真獣類にはない光受容がオポッサムに存在することを強く示唆するものである。

(2) 脊椎動物 Opn3 の分光学的特性の解明

TMT2 オプシンの特性を理解する目的で、TMT2 オプシンの関連遺伝子（パラログ）である脊椎動物 Opn3 について、これまで不明であった分子特性の解明を試みた。培養細胞発現系を用いてさまざまな脊椎動物の Opn3 の組換え光受容タンパク質の生成を行った結果、鳥類と魚類の Opn3 の発現および精製に成功した。分光学的解析の結果、脊椎動物 Opn3 は私たちが以前に報告したフグの TMT1 オプシンと同様、青色感受性光受容タンパク質であることが明らかとなった（図 2）。一方、興味深いことに、Opn3 と TMT1 オプシンでは光反応が異なっており、また、Opn3 は、TMT1 オプシンが活性化する Gi 型 G タンパク質を活性化できなかった。このことは、Opn3 と TMT1 オプシンはともに青色

感受性光受容タンパク質であるが、駆動する光情報伝達系が異なる可能性を示唆している (Sugihara et al., 2016)。

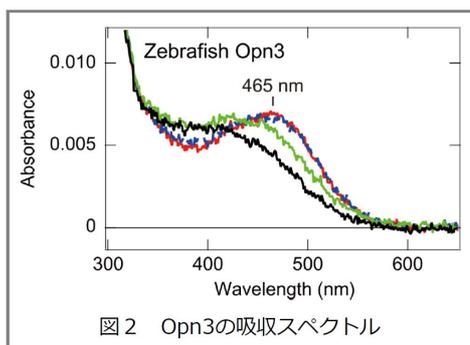


図2 Opn3の吸収スペクトル

また、本研究では、光タンパク質の重要な性質である波長感受性を解析する新しい手法を開発した。具体的には、光受容タンパク質を発現させた培養細胞の光の波長依存的な細胞内情報伝達因子の変化を測定し、細胞応答の波長感受性を求めたところ、光受容タンパク質自身の吸収スペクトルと良く一致した (Sugihara et al., 2016)。これまで、多くの光受容タンパク質が、タンパク質の発現量や安定性が低いために、組換え光受容タンパク質の精製・解析ができず、機能未知であったが、この新手法を用いることで、それらの機能解析の道が開けた。

(3) 眼外光受容タンパク質の分子進化と機能進化との関連

眼外光受容における、光受容タンパク質の性質の多様性と生理機能の多様性との関連を調べる目的で、眼外光受容で最も研究が進んでいる松果体における光受容に着目した解析を行った。私たちは、松果体の波長識別に關与する UV 受容タンパク質・パラピノブシン (PP1) には、魚類の系統で遺伝子重複によって多様化したパラログ (PP2) が存在することを見出した。分光学的解析を行った結果、PP2 は、UV 感受性ではなく、青色感受性光受容タンパク質であることが明らかとなった (Koyanagi et al., 2015)。この結果は、眼外光受容タンパク質が、波長感受性、すなわち“色”感受性に関して多様化したことを明確に示す初めての発見であった。さらに、この2つのパラピノブシンについて、遺伝子導入ゼブラフィッシュを用いた詳細な解析を行った結果、PP1 は他の動物と同様、松果体の波長識別に關与することが示唆されたが、新規に青色感受性を獲得した PP2 は松果体の別の機能であるメラトニン分泌の光制御に關与することが示唆された (Koyanagi et al., 2015) (図3)。この結果は、遺伝子重複に始まるタンパク質機能の多様化と生理機能の多様化との関連を表す良い例であると同時に、眼外光受容においても、生理機能ごとに“色の好み”があることを示すものである (Koyanagi et al., 2015, 2017)。

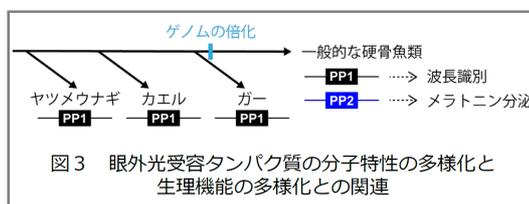


図3 眼外光受容タンパク質の分子特性の多様化と生理機能の多様化との関連

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

M. Koyanagi, E. Kawano-Yamashita, S. Wada, A. Terakita, Vertebrate Bistable Pigment Parapinopsin: Implications for Emergence of Visual Signaling and Neofunctionalization of Non-visual Pigment. *Frontiers in Ecology and Evolution* 5, 23 (2017) 査読有
DOI: 10.3389/fevo.2017.00023

T. Sugihara, T. Nagata, B. Mason, M. Koyanagi, A. Terakita: Absorption Characteristics of Vertebrate Non-Visual Opsin, Opn3. *PLOS ONE* 11, e0161215 (2016) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0161215

M. Koyanagi, S. Wada, E. Kawano-Yamashita, Y. Hara, S. Kuraku, S. Kosaka, K. Kawakami, S. Tamotsu, H. Tsukamoto, Y. Shichida, A. Terakita: Diversification of non-visual photopigment parapinopsin in spectral sensitivity for diverse pineal functions. *BMC Biology* 13, 73 (2015) 査読有
DOI: 10.1186/s12915-015-0174-9

E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi, S. Wada, H. Tsukamoto, T. Nagata, A. Terakita: Activation of transducin by bistable pigment parapinopsin in the pineal organ of lower vertebrates. *PLOS ONE* 10(10):e0141280 (2015) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0141280

H. Tsukamoto, Y. Kubo, D.L. Farrens, M. Koyanagi, A. Terakita, Y. Furutani: Retinal attachment instability is diversified among mammalian melanopsins. *J Biol. Chem.* 290, 27176-27187 (2015) 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M115.666305

[学会発表] (計 32 件)

小柳光正 : Optogenetic potentials of bistable animal opsin-based pigments for regulating GPCR signaling. 第 54 回生物物理学会年会 (招待講演) 2016 年 11 月 26 日 つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

M. Koyanagi: Potential of bistable pigments for optical control of cell signaling. 22nd International Congress of Zoology & 87th

meeting of Zoological Society of Japan (招待講演)(国際学会)2016年11月18日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

M. Koyanagi: Optical control of cell signaling using bistable animal opsin-based pigments. 17th International Conference on Retinal Proteins (招待講演)(国際学会)2016年10月5日 Potsdam (Germany)

T. Sugihara, T. Nagata, B. Mason, M. Koyanagi, A. Terakita: Molecular characteristics of vertebrate non-visual opsin, Opn3. 17th International Conference on Retinal Proteins (国際学会)2016年10月5日 Potsdam (Germany)

M. Koyanagi, T. Sugihara, T. Nagata, K. Arikawa, A. Terakita: Characterization of opsin-based pigments by bioluminescence monitoring of second-messengers in cultured cells. 第40回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第37回大会 合同大会 2015年12月5日 JMS アステールプラザ(広島県・広島市)

小柳光正、杉原智博、永田崇、寺北明久: 非視覚型光受容タンパク質 Opn3 グループの多様性の解析 日本動物学会第86回大会 2015年9月19日 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

M. Koyanagi: Introduction of animal rhodopsins and their optogenetic potentials. 2015年光化学討論会(招待講演) 2015年9月9日 大阪市立大学(大阪府・大阪市)

M. Koyanagi, E. Kawano-Yamashita, S. Wada, T. Nagata, A. Terakita: Activation of Transducin by Bistable Pigment Parapinopsin in the Pineal Organ of Lower Vertebrates. 2015 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES (国際学会)2015年6月15日 Montana (USA)

[図書](計1件)

A. Terakita, T. Nagata, T. Sugihara, M. Koyanagi: Optogenetic Potentials of Diverse Animal Opsins. Optogenetics p409 (p77-88) Springer (2015)
doi:10.1007/978-4-431-55516-2_6

[その他]

新聞報道等

産経WEST 2015年9月23日 “睡眠・生活リズムと光の関係...謎を解く双子遺伝子、魚類で解明”

ホームページ等

大阪市立大学大学院理学研究科生体高分子機能学II研究室

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/mphys/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小柳 光正 (KOYANAGI Mitsumasa)
大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 30379276

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

寺北 明久 (TERAKITA Akihisa)
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 30212062

(4)研究協力者

なし