

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14751

研究課題名(和文) 光再生型オプシンの関わる松果体波長識別機構の生理学的解析

研究課題名(英文) Physiological analysis on mechanisms of the pineal wavelength discrimination involving the bistable opsin

研究代表者

和田 清二 (Wada, Seji)

大阪市立大学・大学院理学研究科・特任助教

研究者番号：90747320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：下等脊椎動物は松果体(光受容器官)でUV光と可視光を識別(“色”を検出)する。これには、眼で知られるように複数の光受容タンパク質が関わりと考えられてきたが、本研究により、一種類の松果体UV光受容タンパク質(光再生型オプシン)の特性により、それ単独の光受容で色情報検出を可能にすることを見出した。これはヒトの色覚の“祖先的なシステム”と示唆された。一方、松果体色情報検出のメカニズムには、複数の光受容タンパク質が関わるパターンが存在し、それらは魚類では同一の細胞に存在するが、円口類ヤツメウナギでは別々の細胞に存在することを示したことから、松果体の色情報検出システムの進化と多様性の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類などの脊椎動物は光感受性の松果体を有し、光の波長(“色”)情報を検出する。本研究では、眼と共通の起源から生じた、松果体という光受容器官に注目し、色情報処理機構について解析した。魚類から爬虫類までの多くの松果体の色情報処理は、共通の分子(光再生型オプシン)を用いながらも多様化していた。原始的脊椎動物である円口類の松果体は部分的に眼と共通の機構で色情報処理するが、魚類では異なっていた。このことは、進化の過程で、魚類があえて眼とは異なる色情報処理機構を獲得したとことを示唆する。すなわち、松果体と眼がそれぞれ光感覚を最適化してきた結果と考えられ、光生物学的、進化学的に重要な知見が得られたと言える。

研究成果の概要(英文)：Lower vertebrates have photosensitive pineal organs, which discriminate UV and visible light (i.e., “color” detection). The pineal color detection has been considered to involve multiple photosensitive proteins (opsins), like the color sensing in eyes. However, in this study, it was found that the property of a pineal UV-sensitive opsin (the bistable opsin) enables the color detection with the UV-sensitive opsin alone. This mechanism, newly found in this study, was suggested to be the “ancestral mechanism” of human color vision. In addition, it was found that a mechanism involving another visible light-sensitive opsin is present as well as the UV-sensitive opsin. These two opsins are present in the same cells in the fish pineal organ. In the lamprey pineal, unlike fish, the two opsins are present in separate cells. These findings suggest the pineal color detection was diversified and optimized after the lamprey split from the ancestral vertebrate.

研究分野：光生物学

キーワード：オプシン opsin 松果体 pineal ゼブラフィッシュ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

爬虫類以下の脊椎動物の多くは、松果体関連器官で光の波長、すなわち“色”を識別する。トカゲの頭頂眼(松果体関連器官のひとつ)はピノプシンとパリエトプシンという二種類のオプシンにより青と緑色の光を識別し、ヒトの色覚と同様に、色情報の検出のために複数のオプシンを利用する。一方で、これまでの研究代表者を含む研究グループが行った研究から、魚類や円口類の松果体の波長識別機構では、UV感受性のパラピノプシンと緑色光感受性パリエトプシンが関わっていると考えられるが(2オプシンシステム)、パラピノプシン単独でも波長識別できる可能性が考えられた(1オプシンシステム)。

2. 研究の目的

本研究は、UV感受性パラピノプシンと緑色光感受性パリエトプシンの2種類のオプシンが、円口類では異なる細胞に発現し、魚類では同一細胞に共発現していることに注目し、1オプシンと2オプシンシステムがどのような光環境のもとで機能するのかを生理学的に検証し、2つのシステムの進化過程を考察することが主たる目的である。それに加えて、魚類ゼブラフィッシュを用いて松果体波長識別の生理的意義を探るために、光受容細胞以降のニューロンの解析を行った。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュのCaイメージング(松果体光受容細胞): ゼブラフィッシュ松果体のパラピノプシン細胞にGCaMPを発現させたシステムを用いて、波長識別応答を記録した。特に、生理学的な光を模擬的に数種類の光源で作出し、どのような条件が、パラピノプシン細胞の波長識別応答を可能にするのかを検証した。

(2) ゼブラフィッシュのCaイメージング(松果体神経節細胞と脳): ゼブラフィッシュ松果体において、パラピノプシン細胞から光情報を受け取る神経節細胞を同定した。さらに、神経節細胞が脳に投射するのかを検討した。

(3) 円口類ヤツメウナギの松果体の細胞内記録(パラピノプシン細胞): 円口類のパラピノプシン細胞が、パラピノプシン単独の波長識別応答(1オプシン応答)を示すのかは不明であったため、細胞内記録法により調べた。1オプシン応答では、パラピノプシンの分子特性である光再生能が関与するので、背景光の存在が不可欠である。そこで、この背景光の強さの条件を検討し、1オプシン応答があらわれるのかを検証した。

4. 研究成果

(1) パラピノプシンはUV感受性の光再生型オプシンである。光再生とは、光の吸収により生じた活性化状態が、もう一度光を吸収し、元の暗状態へと戻る性質のことを指す。つまり、パラピノプシンはUV感受性の暗状態と可視光感受性の光産物(活性化状態)という二状態を光の吸収によって相互変換できる。

ゼブラフィッシュのパ

ラピノプシン細胞に蛍光カルシウムインジケーターであるGCaMP6sを発現させたシステムを用いて、光依存的な応答を蛍光カルシウムイメージングにより解析した。パラピノプシン細胞はUV依存的にカルシウムレベルの低下を示した。また、可視光依存的にカルシウムレベルの上昇を示した。このことは、単一パラピノプシン細胞が波長識別応答をしたことを意味する。つぎに、光再生型でないUV感受性オプシン(SWS1)をパラピノプシンの代わりに発現させた個体を用いると、UVに対するカルシウムレベル低下のみが見られ、可視光に対してはほとんど反応が現れなかった。この結果は、パラピノプシンの光再生という性質が、波長識別応答を生み出していることを示している。このような、一種類の分子の性質によってなされる波長識別応答は、GCaMP6sを励起するための光により、暗状態と光産物が継続的な光吸収により相互変換を経て、光平衡様の状態となり、UVにも、可視光にも反応できる状態になった結果であると考えられる。

次に、生理的な条件下で、このような一オプシン応答が現れるのかを検討した。直射日光の波長成分によく似た白色光源とブロードな波長幅であるLED光源を使用し、夕方ごろのひなたと日陰の波長成分(図1)を模した光照射系(図2上)において、パラピノプシン細胞が波長識別応答を示すことを明らかにした(図2下, Wada et al., PNAS 2018)。一方、ゼブラフィッシュ

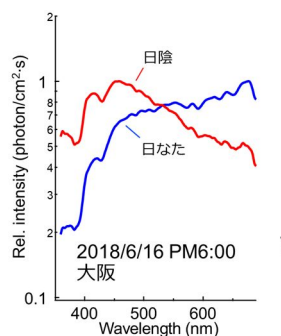


図1. 日なた(長波長が多い)と日陰(短波長が多い)の相対スペクトルが示す波長成分の違い

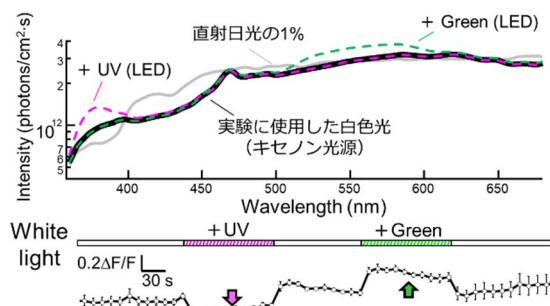


図2. 実験に使用した光(上, +UVが日陰, +Greenが日なたに相当)とパラピノプシン細胞のカルシウムレベル変化が示す波長識別応答(下)

の松果体のパラピノプシン細胞には、可視光感受性のパリエトプシンも存在するが、パリエトプシンを欠損する変異体は、野生型と同様の波長識別応答を示した。また、パラピノプシンを欠損する変異体は、波長識別応答が現れなかった。すなわち、パラピノプシン単独の1オプシンによる波長識別応答が現れていることを見出した。以上のことから、1オプシンシステム(パラピノプシン単独)は、日中から夕方などの比較的強い環境光下で動作することを示唆している。トカゲの頭頂眼などにおいて知られる波長識別機構は、一般的に太陽が水平線より低い位置にある日の出、日の入りの直前直後の光の弱い時間帯で、劇的に変わる波長成分を検出していると議論される。パリエトプシンは光再生型ではない可視光受容タンパク質であるため、弱い環境光下で、光平衡様の状態を形成していないパラピノプシンとともに波長識別応答を担っていることが示唆される。

(2) ゼブラフィッシュ松果体の神経節細胞をカルシウムイメージングにより解析し、先行研究でも報告されている可視光感受性の“非感色性”の応答(明るさ検出)とUVと可視光に対して拮抗的な“感色性”応答(波長識別応答)を示す神経節細胞を見出した(図3)。さらに、中脳にパラピノプシン細胞の光応答と酷似した拮抗性応答を示す細胞を見出し、パラピノプシンを欠損した個体においてはその応答が消失することを明らかにした。すなわち、松果体由来の神経性の光情報が脳に伝わるのが生理学的に捉えることができた。これは、松果体も網膜のように神経性の光情報を中枢へ送ることを示した初めての知見である。

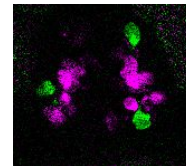


図3. ゼブラフィッシュ松果体の神経節細胞(マゼンタ、非感色性; 緑、感色性)

(3) 円口類カワヤツメ松果体の光受容細胞の電気生理学的解析を実施した。円口類ヤツメウナギの松果体ではパラピノプシンとパリエトプシンが別々の光受容細胞に発現する。パリエトプシン細胞は光依存的に脱分極する。一方、パラピノプシン細胞は光依存的に過分極性応答する。ゼブラフィッシュのパラピノプシン細胞と同様に、背景光が存在したとき、1オプシンによる波長識別応答(パラピノプシン単独)が現れるのかを検討した。その結果、光受容細胞の1オプシン応答を捉えることに成功した。具体的には、背景光なしの条件で、UVに対して過分極性応答を示すパラピノプシン細胞が、白色光が背景にある条件で、可視光に対し脱分極性応答を示した。すなわち、パラピノプシンの暗状態と光産物の光平衡が白色光によって生成され、可視光感受性の光産物が、暗状態へと戻ることによって、過分極性応答の減少として、脱分極性応答があらわれたと考えることができる。したがって、硬骨魚類と同様に、円口類においても1オプシンによる波長識別システムが機能的であることが示唆された。

(4) 以上のことから、円口類と魚類の波長識別システムの進化のプロセスを以下のように考察した。

パラピノプシンが示す光再生という分子の特性は、無脊椎動物の視物質や、他のオプシンのグループでも保存されていることから、祖先的な特徴であると一般的に理解されている。したがって、原始的な松果体波長識別システムは、パラピノプシンのような、光再生能を有するオプシン単独によるシステムとして脊椎動物の祖先動物において獲得されていたと考えられる。

上述のように、パラピノプシン単独の波長識別能は、パラピノプシンの暗状態と光産物の平衡によりもたらされる。これには強い光を必要とするため、弱い光に対しての波長識別システムとして、可視光感受性のパリエトプシンのようなオプシンを有する光受容細胞を獲得し、ヤツメウナギで見られるような二つの光受容細胞(2細胞2オプシン)による、波長識別を完成させた。

2細胞2オプシンシステムでは、強い光条件においては、パリエトプシン細胞の光応答の飽和によって、神経節細胞は神経発火を起こすため、一定のバックグラウンドのもとパラピノプシン単独の波長識別がなされていたと捉えられる。現在の魚類の松果体のパラピノプシン・パリエトプシン細胞(1細胞2オプシン)において、パラピノプシンはパリエトプシンの生み出すバックグラウンドをほとんど抑制できるため、パラピノプシン単独の波長識別においては、1細胞2オプシンシステムの方が高い波長解像度を得られると考えられる。したがって、脊椎動物の祖先からヤツメウナギが分かれた後に、波長解像度を高めるため、2細胞2オプシンシステムから、1細胞2オプシンシステムが生み出されたと想像される。

本研究では、魚類ゼブラフィッシュと円口類ヤツメウナギを用いて、松果体の波長識別システムを比較解析し、システムが脊椎動物で多様化していることや、基本的にはパラピノプシンとパリエトプシンという共通の分子基盤を用いていることを明らかにした。また、生理学的な観点からそのシステムの進化のプロセスを考察した。脊椎動物の視覚の成り立ちを考えると、祖先脊椎動物は、多様化したオプシン(視物質)をそれぞれ専用のひとつの細胞にあてはめることで、波長情報を取得する複数の入力系(ヒトであれば赤、緑、青の3色)を用意し、神経ネットワークによる高度な情報処理によって、さまざまなレベルの波長情報から成るカラフルな視覚を得られるようになったと言える。それに対し、ゼブラフィッシュ松果体の“色”の入力系はパラピノプシン細胞によって出力される1次元の処理機構と言える。したがってこの進化プロセスは、1次元で幅広く波長解像度の高い情報を得るためにおこったのかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wada Seiji, Shen Baoguo, Kawano-Yamashita Emi, Nagata Takashi, Hibi Masahiko, Tamotsu Satoshi, Koyanagi Mitsumasa, Terakita Akihisa	4. 巻 115
2. 論文標題 Color opponency with a single kind of bistable opsin in the zebrafish pineal organ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 11310 ~ 11315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1073/pnas.1802592115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Seiji Wada, Baoguo Shen, Mitsumasa Koyanagi, Akihisa Terakita
2. 発表標題 A signaling pathway of “color information” generated in parapinopsin-expressing pineal photoreceptor cells to brain neurons in zebrafish
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第41回東京大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoka Saito, Seiji Wada, Baoguo Shen, Genki Nakata, Mitsumasa Koyanagi, Akihisa Terakita
2. 発表標題 Evaluating contribution of pineal opsin, parapinopsin-based color opponency to preference for dark and light in zebrafish larvae
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第41回東京大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Wada, Mitsumasa Koyanagi, Akihisa Terakita
2. 発表標題 Chromatic response with a single kind of opsin in the zebrafish pineal organ
3. 学会等名 FASEB SRC, The Biology & Chemistry of Vision (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 清二, 沈 宝國, 山下(川野) 絵美, 永田 崇, 日比 正彦, 保 智己, 小柳 光正, 寺北 明久
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ松果体における“色”情報検出を担う光受容体
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大阪大会シンポジウム 非視覚タイプの光環境応答とメカニズム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 清二, 小柳 光正, 寺北 明久
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ松果体における非感色性光応答を担う光受容タンパク質の解析
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沈 宝國, 和田 清二, 永田 崇, 山下(川野) 絵美, 小柳 光正, 寺北 明久
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ松果体における波長検出に関わる光受容タンパク質パラピノプシンの不活性化機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下(川野) 絵美, 由良 南々帆, 小柳 光正, 和田 清二, 寺北 明久, 保 智己
2. 発表標題 無顎類ヤツメウナギの脳深部に存在する新規光受容器官の非視覚オプシンに着目した組織学的解析
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田 玄樹, 和田 清二, 小柳 光正, 寺北 明久
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおいて松果体光受容タンパク質が関わる光点灯時の遊泳活性の制御
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 清二, 沈 宝國, 山下(川野)絵美, 永田 崇, 日比 正彦, 保 智己, 小柳 光正, 寺北 明久
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ松果体における1種類のオプシンに基づく波長検出応答
3. 学会等名 第20回光生物学協会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seiji Wada, Baoguo Shen, Emi Kawano-Yamashita, Takashi Nagata, Masahiko Hibi, Satoshi Tamotsu, Mitsumasa Koyanagi, Akihisa Terakita
2. 発表標題 Analyses of pineal photoresponses using opsin-deficient and -replaced zebrafish mutants
3. 学会等名 第24回小型魚類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田 清二, 沈 宝國, 山下(川野)絵美, 永田 崇, 日比 正彦, 保 智己, 小柳 光正, 寺北 明久(2018)
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ松果体における波長識別を担う光受容体
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田 清二, 沈 宝國, 山下(川野)絵美, 永田 崇, 日比 正彦, 保 智己, 小柳 光正, 寺北 明久(2018)
2. 発表標題 松果体におけるパラピノプシンの寄与する光応答と自然光との関わり
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seiji Wada, Baoguo Shen, Emi Kawano-Yamashita, Takashi Nagata, Masahiko Hibi, Satoshi Tamotsu, Mitsumasa Koyanagi, Akihisa Terakita
2. 発表標題 Relationship between pineal wavelength discrimination involving parapinopsin and natural light conditions in the zebrafish
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第40回大会,
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田 清二, 沈 宝國, 山下(川野)絵美, 永田 崇, 日比 正彦, 保 智己, 小柳 光正, 寺北 明久
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ松果体の単一オブシンによる色情報検出
3. 学会等名 第13回バイオイメージングフォーラム&基礎生物学研究所重点共同利用 合同シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Wada, Baoguo Shen, Emi Kawano-Yamashita, Takashi Nagata, Masahiko Hibi, Satoshi Tamotsu, Mitsumasa Koyanagi, Akihisa Terakita
2. 発表標題 Color opponency with a bistable pigment parapinopsin in the zebrafish pineal organ
3. 学会等名 18th International Conference on Retinal Proteins(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seiji Wada, Baoguo Shen, Emi Kawano-Yamashita, Takashi Nagata, Masahiko Hibi, Satoshi Tamotsu, Mitsumasa Koyanagi, Akihisa Terakita
2. 発表標題 Detection of “color changes” with a single kind of opsin in the zebrafish pineal organ.
3. 学会等名 10th OCARINA International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----