

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19207006

研究課題名（和文） ロドプシン類の多様性とその協調的機能発現の分子生理学的解析

研究課題名（英文） Molecular physiological study on diversity of rhodopsins and their cooperative function.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：眼を持つ最も下等な動物である刺胞動物に新しい光受容タンパク質ロドプシン類と光情報をキャッチするシステムを発見し、ロドプシン類と光受容細胞との進化的連関を初めて明らかにした。また、下等脊椎動物の松果体で機能するロドプシン類の比較解析により視覚のロドプシン類が情報伝達タンパク質の進化を促進したことを示唆した。さらに、トカゲ類の頭頂眼等では、1つの光受容細胞中に異なるロドプシン類が存在し、協調的に機能していると考えられた。

研究成果の概要（英文）： In this study, we found a novel rhodopsin and a novel light-signaling system in eyes of cnidarian, which is one of most primitive animals with developed eyes, suggesting an evolutionary linkage between rhodopsins and photoreceptor cell-types. We also comparatively analyzed rhodopsins in pineal organs of lower vertebrates and suggested that vertebrate visual pigments might promote molecular evolution of light-signaling proteins. In addition, our analyses on lizard parietal eyes suggest that two kinds of rhodopsins co-operatively function in a single photoreceptor cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2008年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2009年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
年度			
総計	39,300,000	11,790,000	51,090,000

研究分野：動物分子生理学

科研費の分科・細目：基礎生物・動物生理行動

キーワード：ロドプシ、光受容、シグナル伝達、視覚、非視覚、多様性、動物生理化学

1. 研究開始当初の背景

眼において光をキャッチするタンパク質である視物質ロドプシンやそれに類似した光受容タンパク質（以後ロドプシン類と呼ぶ）は、視覚や生体リズムの調節などの「光受容」という機能の入り口に位置するので、ロドプシン類の分子特性や性状が光受容そのものの多

様性に大きく関連すると考えられる。したがって、ロドプシン類の多様性の解析は、動物の光受容能を理解する上で重要かつ必須と言える。これまでに2000種類以上のロドプシン類が多様な動物から同定され、それらはアミノ酸配列の相同性に基づき動物種を越えた8種類のサブグループに分類され、共役するG

蛋白質の種類や分子の性質などによる分類とよく一致する。例えば、ヒトは5種類のサブグループ由来の9種類のロドプシン類遺伝子をもつ。私たちはこれまでに、生体内には微量しか存在せずその解析が困難であったロドプシン類を培養細胞系により発現させて、分子の性質や分子機能を解析するとともに、多様なロドプシンの特徴を生み出す仕組みについて変異体を用いて解析してきた。当初、私たちは最も下等な眼を持つ動物である刺胞動物のアンドクラグから新奇ロドプシンの遺伝子を単離し、培養細胞で発現させることに予備的に成功していた。アンドクラグの進化的な位置づけやロドプシン新奇性から、その性質やシグナル伝達系はロドプシン類の多様性や進化を考える上でカギとなると期待された。

一方、King-Wai Yau 教授 (Johns Hopkins 大学) との共同研究として、トカゲの第三の眼として知られる頭頂眼では、一個の光受容細胞中の中に、緑感受性のパリエトオプシンと青色感受性のピノプシンとが、2種類の異なるG蛋白質をそれぞれ介して細胞内の二次メッセンジャーの分解酵素 (cGMP 分解酵素) の活性を調節し、1つの光受容細胞だけで緑色光と青色光の色の違いを検出していることを発見していた。このことは、多様なロドプシン類が個々の機能に加えて、1つの細胞内で協調して新たな機能を発現していることを示している。すなわち、「ロドプシン類の分子の多様性」と「光受容という機能の多様性」の連関を理解するためには、多様なロドプシン類の個々の分子特性や分子機能の解析に加えて、それらの協調的な機能発現を理解することが重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、次の2点を目的とした。

(1) ロドプシン類の多様性と進化に関する研究：刺胞動物 (二胚葉動物) は眼を持つ最も下等な動物であるので、その新奇ロドプシンの性質や光信号を神経信号に変換する情報伝達系を解明し、既知のもとと比較して、ロドプシン類や光情報伝達系の多様性や進化を解明する。また、脊椎動物の視物質と視覚以外光受容体の多様化を解析する目的で、エンセファロプシンの分子特性や眼外光受容体であるパラピノプシンの情報伝達系について解析する。さらに、未だ発現に成功していないニューロプシングループについて発現解析系の確立を試み、個々の分子性状を比較する。以上の結果から、祖先型から脊椎動物視物質がどのように多様化・進化したかについて考察する

(2) ロドプシン類の協調的機能発現に関する研究：トカゲ類の頭頂眼における UV 光と可視光の波長識別では、青色光と緑色

光の識別と類似して、1つの細胞内でのパリエトオプシンが関わる2種類のロドプシン類による協調的機能発現がみられるのかを明らかにする。また、ゲノム配列が明らかになっているハマダラカから単離したエンセファロプシンは、予備的解析の結果、視細胞内に視物質と共局在している可能性が考えられた。そこで、どのような種類の視物質と協調的に働いているのかを解析し、協調して機能している生物学的な意味について、解明を試みる。一方で、トラフグやゼブラフィッシュにおいては、哺乳類において概日リズムの調節に関与するメラノプシンが複数存在し、それらは2つのサブグループに分類される。私たちは、それらがともに網膜に局在していることを見いだしていたので、異なるメラノプシンが同じ細胞に存在し、協調的に機能しているのかについて解析する。

3. 研究の方法

(1) タンパク質をコードする遺伝子のクローニング：PCR法を用いて、目的とするタンパク質の遺伝子や mRNA を増幅し、その配列を決定した。

(2) ロドプシン類の分子特性の解析：眼外の光受容器官や小さな眼に微量しか存在しないロドプシン類を解析するために、ロドプシン類の遺伝子を培養細胞に導入し、タンパク質を強制的に発現させた。発現させたタンパク質に発色団であるレチナルを加えて光受容能を持たせた後、分光学的、生化学的にロドプシン類の分子特性を解析した。

(3) ロドプシン類や情報伝達関連タンパク質の局在の解析：局在の解析は、それぞれのタンパク質に対する特異的な抗体を作製し、免疫組織化学的にタンパク質の存在場所を染色することにより解析した。また、それぞれのタンパク質の mRNA の局在も *in situ hybridization* 法により解析した。

(4) 情報伝達系の解析：ロドプシン類によるGタンパク質の活性化は、放射性同位元素により標識されたGTP(グアニントリヌクレオチド)アナログを用いて、試験管内で生化学的に行った。あるいは、培養細胞を用いて、細胞内で起こるシグナル伝達系を生化学的に同定した。

4. 研究成果

(1) ロドプシン類の多様性

①刺胞動物の視物質と新しいGs型Gタンパク質が関わる光情報伝達系の発見：

これまでロドプシン類が同定されている光受容細胞はすべて三胚葉動物のものであったので、三胚葉動物が出現する前に分岐したクラゲのような刺胞動物 (二胚葉動物) の

ンが機能していることを見出した。一般に、 β アレスチンはロドプシン類（光受容体）ではなく、ホルモンや神経伝達物質を受容する G タンパク質共役型受容体（GPCR）に結合することが良く知られている。すなわち、図 3 に示すように、視物質の出現前では、ロドプシン類は「光」専用でないアレスチンと共役していたが、脊椎動物の視物質の出現とともに視覚アレスチンが共進化してきたと考えられた。興味深いことに、 β アレスチンは活性化型の GPCR に結合し、その分子を情報伝達系から除去する働きがある。一方、視覚アレスチンはその機能が失われている。視覚アレスチンと共役する視物質ロドプシンは光産物が自身の性質により退色して機能を失うので、アレスチンの働きによって除去する必要がない。そのために、視覚アレスチンはロドプシン類の活性化型である光産物を除去する能力が失われたと考えられた。すなわち、分子進化の過程において、視物質は退色し光産物が崩壊するという分子特性が備わり、それに伴って、共役するアレスチンから光産物を除去する能力が失われていったと推測される。これらの結果は、視物質と情報伝達タンパク質の共進化を初めて示した例として、高く評価されている。

(2) ロドプシン類の協調的機能発現

① トカゲ類の頭頂眼における UV 光と緑色識別機構：

ヤツメウナギ松果体での UV 光と緑色光の波長識別は、UV 受容体としてパラピノプシンを含む UV 受容細胞と緑色光受容細胞（光受容タンパク質は不明）の 2 種類の細胞によりなされていると考えられている。一方、トカゲの松果体関連器官である頭頂眼では、青色光と緑色光の識別は青色光受容体ピノプシンと緑色光受容体パリエトオプシンの両方を含む 1 つの細胞によりなされている。ある種トカゲの頭頂眼は UV 受容能があることが明らかになっている。そこで、UV に対する応答性が報告されているグリーンイグアナの頭頂眼を用いて、UV 光と可視光の波長弁別がどのようにな

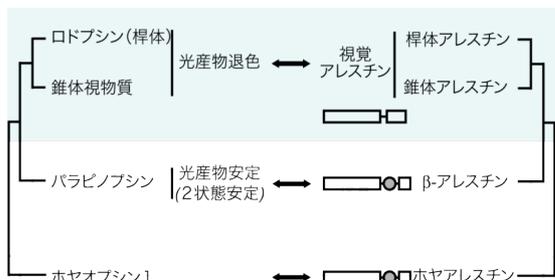


図 3：脊椎動物のロドプシン類とアレスチンの進化的関連

されているのかを解析した。その結果、UV 受容タンパク質としてパラピノプシン、緑色光受容タンパク質としてパリエトオプシンが同一細胞に存在していることが明らかになった。すなわち、単一細胞内で 2 つのロドプシン類が協調して UV 光と緑色光の弁別を実現していることが示唆された。このことから、様々な動物種の松果体関連器官における UV 光受容タンパク質はパラピノプシンであり、共通していると考えられた。この共通性の発見により、パラピノプシン重要性が広く認知された。

② ハマダラカ視細胞における 2 種類のロドプシン類の協調的機能発現：

ハマダラカのエンセファロプシンを培養細胞系で発現し解析した結果、可視光受容タンパク質であることが明らかになった。その個眼での分布を組織学的に調べた結果、エンセファロプシンは個眼の中に存在する 8 個の視細胞の中の特定の 1 つの細胞に存在することを見出した。そのエンセファロプシンが存在している視細胞で発現する視物質を分子生物学的手法、組織化学的手法、培養細胞によるロドプシン類の発現により解析した結果、青色光感受性の視物質が発現していることを明らかにした。エンセファロプシンにより駆動される報伝達系が、視物質により駆動されるものと同一なのかを調べるために、G タンパク質の活性化能を解析した。その結果、視物質が駆動する Gq 共役系とは異なるカスケードをエンセファロプシンが駆動することを発見した。すなわち、ハマダラカの特定の視細胞においては、エンセファロプシンと視物質が光を効率よくキャッチして、異なる情報伝達系を用いて協調的に機能していることが示唆された。

③ 硬骨魚類の多様なメラノプシン：

メラノプシンは哺乳類では概日リズムの光受容体として機能している。一方、哺乳類以外の脊椎動物には 2 種類（哺乳類型と非哺乳類型）のメラノプシンが存在している。さらに、硬骨魚類では哺乳類型と非哺乳類型それぞれに少なくとも 2 種類存在している。そこで、多様なメラノプシンが同一細胞内で協調して機能しているのかを魚類を用いて解析した。その結果、トラフグでは、2 種類の哺乳類型メラノプシンは異なる細胞に存在し、また非哺乳類型とも異なる細胞に存在し、同一細胞内での協調的な働きはしていないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 16 件）

- ① E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi, Y. Shichida, T. Oishi, S. Tamotsu, A. Terakita. Beta-arrestin functionally regulates the non-bleaching pigment parainopsin in lamprey pineal. *PLoS One* 6, e16402 (2011) 査読有
- ② H. Tsukamoto and A. Terakita: Diversity and functional properties of bistable pigments. *Photochem Photobiol Sci.* 9, 1435-1443 (2010) 査読有
- ③ H. Tsukamoto, D. L. Farrens, M. Koyanagi and A. Terakita: The magnitude of the light-induced conformational change in different rhodopsins correlates with their ability to activate G proteins *J. Biol. Chem.* 284, 20676-20683 (2009) 査読有
- ④ A. Terakita, H. Tsukamoto, M. Koyanagi, M. Sugawara, T. Yamashita and Y. Shichida: Expression and comparative characterization of Gq-coupled invertebrate visual pigments and melanopsin. *J. Neurochem.* 105, 883-890 (2008) 査読有
- ⑤ M. Koyanagi, K. Takano, H. Tsukamoto, K. Ohtsu, F. Tokunaga and A. Terakita: Jellyfish vision starts with cAMP signaling mediated by opsin-Gs cascade. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 105, 15576-15580 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計75件)

- ① A. Terakita: Functional characterization of non-visual bistable pigments, The 14th International Conference on Retinal Protein, アメリカ合衆国・サンタクルズ, 2010年8月6日
- ② A. Terakita: Molecular and functional properties of non-visual bistable pigments, FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCE 2009, アメリカ合衆国・スノーマス, 2009年6月15日

〔図書〕(計3件)

- ① A. Terakita: Diversity and evolution of animal rhodopsin and phototransduction cascade. In “Photobiology: Principles, Applications and Effects” (ed. Leon N. Collignon and Claud B. Normand), pp179-193, Nova Science Publishers, Inc., New York (2010)
- ② 寺北明久: 光を受容するさまざまな分子 “シリーズ『動物の多様な生き方』第1巻 見える光, 見えない光: 動物と光のかかわり”, 共立出版, pp1-21, 2009年

〔その他〕

ホームページ等
(新聞報道)

- ① 朝日新聞 “視覚、クラゲから?” 2008年10月6日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

なし