

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06758

研究課題名(和文)動物の環境応答行動を制御する光センシング機構とその個体成長での転換

研究課題名(英文)Light-sensing mechanism regulating behavioral responses to environmental changes in animals and its developmental conversion

研究代表者

小島 大輔(KOJIMA, Daisuke)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：60376530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：動物の光環境応答行動として、ゼブラフィッシュの体色変化の様式が成長過程でスイッチングすることに注目し、光センシング機構の分子メカニズムを解析した。その結果、成魚型の体色変化を制御する光受容分子群を同定し、また、幼生型の体色変化を光制御する分子の特性を明らかにした。さらに本研究では、動物の環境応答行動を制御する光センサー細胞がどのような制御を受けて多様化・機能分化しているか、という点に着目した解析を行い、網膜の青錐体細胞の分化や特異的遺伝子発現を制御する鍵分子を同定した。また、体色変化を引き起こすホルモンの内分泌器官、松果体に特異的な遺伝子発現をもたらす転写因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境刺激に応答して体の一部を変化させる「体色変化」は古くより多くの研究者の興味を惹き付けてきた研究課題であるが、その環境応答性の分子メカニズムは未だに謎が多い。また私たちが発見した「体色変化パターンのスイッチング」は、発生・成長における個体レベルの光応答性の転換という点で非常にユニークな現象である。本研究では、このスイッチング前後で光応答を制御する光センサー分子群を同定し、また、その波長特性を明らかにした。さらに、光センサー細胞の発生・分化に関わる転写因子群の同定にも成功した。今後本成果を発展させることにより、光応答性スイッチングのメカニズム解明へつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to understand molecular aspects of light-sensing mechanisms regulating animal behaviors, focusing on body color changes and their developmental conversion in larval zebrafish. We identified a group of photoreceptor molecules that control the adult-type body color change, and also characterized a spectral property of the putative photoreceptor molecule that controls the larval-type body color change. The present study further analyzed the functional diversification and differentiation of the photoreceptor cells, and identified a key molecule that controls the differentiation and specific gene expression of the retinal blue cone visual photoreceptor cells in zebrafish. We also identified a transcription factor which confers specific gene expression in the zebrafish pineal gland, a light-sensitive endocrine organ secreting a hormone that cause body color changes.

研究分野：動物の光感覚の分子メカニズム

キーワード：光受容 ゼブラフィッシュ 体色変化 網膜 オプシン 錐体 松果体 転写制御

## 1. 研究開始当初の背景

動物の体表は様々な色・模様（体色）を呈しているが、真骨魚類などの変温脊椎動物は様々な環境刺激、特に『光』に応答して体色を素早く変化させることが知られている。例えばヒラメやカメレオンは体色を背景そっくりに変化させること（背地適応：図1）により、捕食者や被食者から自己をカモフラージュする。真骨魚類の背地適応を制御する光感受部位は眼球に存在することはほぼ一世紀前から知られていた [von Frisch 1911 *Pflüger's Arch*]。従来、眼球の光受容細胞は視細胞のみであると認識されていたため、視細胞が背地適応を光制御すると考えられてきた。しかし近年、私たちや他のグループの研究により、ゼブラフィッシュ幼生の背地適応には視細胞は必要でなく、視細胞以外の網膜ニューロンが体色の光制御に関与することが強く示唆された [Muto *et al.* 2005 *PLoS Genet* など]。これらの網膜ニューロンの一部はロドプシンに類似した光受容分子群（非視覚オプシン）を発現することから [Kojima *et al.* 2000; 2008a など]、非視覚オプシンを発現する網膜ニューロンが背地適応を光制御するのではないかという仮説に至った（図2）。

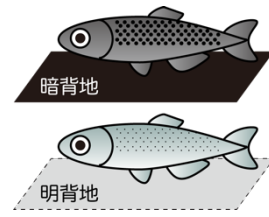


図1：真骨魚類の背地適応

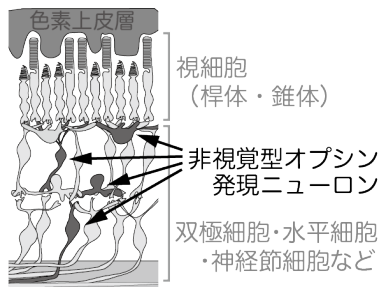


図2：網膜を構成する細胞群

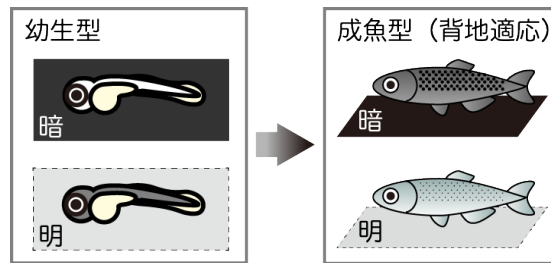


図3：体色変化のスイッチング

私たちはまた、ゼブラフィッシュの発生・成長の過程で体色変化パターンが「幼生型」から「成魚型」へと転換することを見出している [Shiraki *et al.* 2010; 図3]。すなわち5日齢で見られる背地適応（成魚型：図3右）とは逆に、2日齢幼生では光依存的に体色が暗化する（幼生型：図3左）。さらに、2日齢の体色暗化を駆動する光感受部位は眼球ではなく、胴体にあることがわかった。これらの結果から、どのような光受容分子が幼生型の体色変化を駆動するのか、また、幼生型から成魚型への行動様式のスイッチングがどのようなメカニズムで起こるのか、が未解決の問題として浮かび上がってきた。

## 2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、体色変化に関与する光受容分子・光受容細胞を同定し、体色変化の光制御の最初期過程を明らかにすることである。私たちはこれまでに、野生型ゼブラフィッシュ幼生の成魚型体色変化（背地適応）における光作用スペクトルを測定することに成功し、この光応答には波長感受性の異なる、少なくとも2種類の光受容分子が関与することが示唆された（P416とP470：図4）。さらに、視細胞を欠損させた個体の体色変化解析を行った結果より、P416は視細胞に、P470は視細胞以外の網膜ニューロンに存在すると考えられた。そこで本研究ではまず、P416とP470それぞれの候補遺伝子群のノックアウト系統を解析し、背地適応の光制御に関与するオプシン遺伝子の同定を試みる。さらに同定されたオプシン遺伝子の発現細胞を生体組織において同定し、これらの細胞を含む網膜内の神経回路を探索する。このような「成魚型」体色変化の光制御メカニズム解析とともに、「幼生型」体色変化に関与する光受容分子・光受容細胞を同定し、体色変化の光センシング機構が個体の成長過程でどのようにスイッチングするのかを比較解析する。さらに、このような光センサー細胞が個体の発生・成長においてどのような制御を受けて多様化・機能分化しているかという点にも着目し、光センサー細胞の分化を制御する因子の同定も試みる。

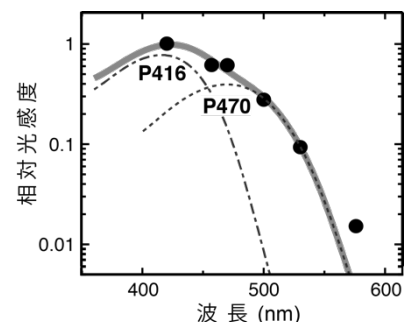


図4：背地適応の光作用スペクトル

### 3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュ幼生の体色変化測定：ゼブラフィッシュ幼生（2日齢もしくは5日齢）をアガロースゲル中に生きたまま無麻酔で保定し、測定装置のステージにセットした後、赤外光と CCD カメラを用いて体色（メラニン色素の分布）を経時的にイメージ取得した。刺激光として可視光（白色光もしくは単一波長光）を幼生の腹側から照射した。

(2) 組換え系統の作製：CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集をゼブラフィッシュに適用し、標的遺伝子のノックアウト (KO) 系統や、標的遺伝子の近傍に GAL4 遺伝子をノックインした系統を樹立した。また、改変 BAC コンストラクトを用いた遺伝子導入実験により、蛍光タンパク質遺伝子や経シナプストレーサーを特異的に発現する組換えゼブラフィッシュを作製した。

### 4. 研究成果

(1) 背地適応を制御する光受容分子群：動物の光環境応答の一つ「背地適応」の光制御には少なくとも 2 種類の光受容分子 P416 と P470 が関与し、P416 は視細胞、P470 は視細胞以外の網膜ニューロンに存在する。P416 を同定するため、青錐体オプシン KO 系統に加え、緑錐体オプシンや UV 錐体オプシンの発現がそれぞれ大きく減弱する変異系統を作製・入手して体色変化解析を行ったが、いずれの系統でも背地適応に異常は見られないことがわかった。複数の光受容分子が P416 として機能する、もしくは錐体オプシン以外の光受容分子が視細胞に発現して P416 として機能する可能性が考えられる。一方、P470 の候補として 5 種類のメラノプシン遺伝子の単一ノックアウト (KO) 系統を樹立し、体色変化解析を行ったところ、この中の一つの KO 系統が緑色光に対して感度低下を示した。そこで、他のメラノプシン KO 系統との二重変異体を系統的に作製して体色変化解析を行ったところ、ある組合せの二重変異体では、広い範囲の光強度で背地適応が異常を示すことがわかった。これら 2 つのメラノプシンは、異なる明るさの光環境下で背地適応を制御することが示唆された。

(2) 背地適応を制御する光受容細胞の同定と網膜内神経回路：背地適応の光制御には、視細胞 (P416 が発現) と視細胞以外の網膜ニューロン (P470 が発現) の両者が関与する。これらの光受容細胞どうしがどのような神経回路を形成するかを調べるため、各細胞を蛍光タンパク質により標識したゼブラフィッシュ系統や、経シナプストレーサーを一過的に発現させた個体を用いて、高解像度顕微鏡システムによる蛍光観察を行った。その結果、視細胞の一部と P470 発現細胞とが直接神経接続することが強く示唆された。そこでさらに、これらの細胞が機能的に神経接続しているかどうかを確かめるため、細胞特異的な破壊実験が可能な GAL4-UAS 系統の樹立を目指した。具体的には、背地適応に関わるオプシン遺伝子の近傍に、CRISPR/Cas9 を用いて GAL4 遺伝子をノックインすることを試みた。その結果、上記のメラノプシン発現細胞にレポーター遺伝子発現を誘導する、GAL4 ドライバー系統の樹立に成功した。この系統では他の網膜ニューロンの一部にもレポーター発現が誘導されたため、今後の研究ではさらに特異性の高い系統を樹立することが望まれる。

(3) 幼生型体色変化を制御する光受容分子：背地適応は 5 日齢幼生や成体において観察されるが、2 日齢幼生はこれとは異なり、光依存的な黒色化を示す (図 3 左)。このような幼生型体色変化を制御する光受容分子の波長特性を推定するため、2 日齢幼生において 420~580nm の単一波長の刺激光に対する体色変化の感度を測定した。その結果得られた光作用スペクトルは、成体型のものとは大きく異なることがわかった。幼生型体色変化は背地適応制御とは別の光受容分子により制御されると考えられる。そこでさらに、この光作用スペクトルにもとづいて光受容分子の候補遺伝子群を絞り込み、8 個の候補遺伝子について KO 系統を作製もしくは入手した。これらの KO 個体の 2 日齢における体色変化を測定したところ、いずれも野生型との有意な差は検出されなかった。今後は複数の光受容分子の寄与も念頭におき、これらの系統の多重変異体や他の KO 系統を用いた解析により光受容分子の同定を目指す。

(4) 青錐体分化の制御因子 Foxq2：青錐体視細胞は背地適応に関わる光受容細胞の候補の一つである。これまで私たちは、ゼブラフィッシュ網膜の 4 種類の錐体のうち、青錐体と緑錐体の両方を制御する転写因子を明らかにしたが、両者をどのように区別して制御するかは謎のままであった。そこでさらに研究を進めた結果、脊椎動物種に広く保存されているにもかかわらず機能未知であった転写因子 Foxq2 が、青錐体オプシン遺伝子の転写スイッチ制御や、青錐体サブタイプの分化に必須の鍵分子であることを見出した (図 5)。比較ゲノム解析により、青錐体オプシン遺伝子をもつ動物種 (真骨類、鳥類、爬虫類) では foxq2 遺伝子は維持されているが、青錐体オプシン遺伝子の欠失した哺乳類では foxq2 遺伝子も失われていることがわかった。Foxq2 は脊椎動物の進化初期において錐体の多様化を生み出したメカニズムの一つであると考えられる。この成果は国際誌 [Ogawa *et al.* *Science Adv* 2021] に報告した。

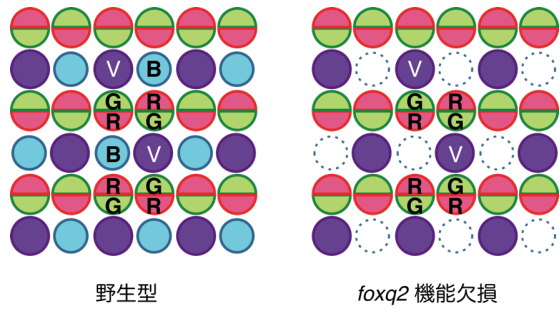


図5:ゼブラフィッシュ網膜における錐体モザイクの比較。正常な網膜(左)では、赤(R)・緑(G)・青(B)・紫(V)の錐体が格子モザイク状に配列する。Foxq2を機能欠損した網膜では青色錐体サブタイプが欠損することが分かった。

(5) メラトニン分泌器官の遺伝子発現と発生を制御する鍵分子Bsx: 体色変化を引き起こすホルモンの一つ、メラトニンは脳内の松果体から分泌される。とくに、鳥類や真骨魚類の松果体はそれ自身で光を感じ、メラトニン分泌が光依存的に抑制される。このような松果体の特異性が、いかなる分子メカニズムによりもたらされているのかは、これまで謎として残されていた。本研究ではゼブラフィッシュを用いて、進化学的・発生学的に密接に関連する松果体光受容細胞と網膜視細胞との比較解析や遺伝子組換え実験を行い、松果体に特異的な遺伝子発現を制御する転写因子Bsxを同定した(図6)。個体レベルでBsxの機能を解析した結果、Bsxは松果体ニューロンの発生・分化に必須であることがわかった。松果体はメラトニン分泌という種を越えて保存された機能をもつが、Bsxはこのような松果体の機能発現に重要な役割をもつと考えられる。この成果は国際誌 [Mano et al. *Commun Biol* 2019] に報告した。

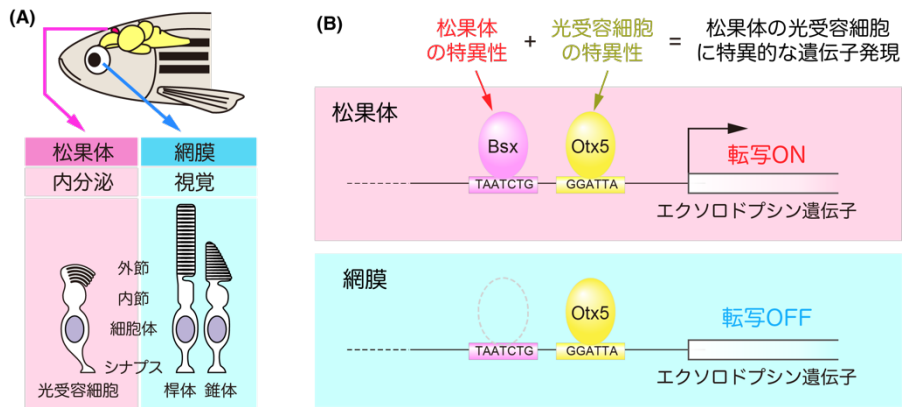


図6:似て非なる光受容器官:松果体と網膜。(A) 松果体と網膜の機能・光受容細胞の比較。

(B) エクソロドプシン遺伝子の特異的な遺伝子発現のしくみ。松果体の光受容細胞(上)は、松果体の特異性を担う転写因子Bsxと、光受容細胞の特異性を担う転写因子Otx5の両方を持つので、エクソロドプシン遺伝子の転写がONになる。一方、網膜の光受容細胞(下)にはBsxが存在しないので、エクソロドプシン遺伝子の転写がOFFになる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogawa Yohey, Shiraki Tomoya, Fukada Yoshitaka, Kojima Daisuke	4. 巻 7
2. 論文標題 Foxq2 determines blue cone identity in zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabi9784
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abi9784	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 -

1. 著者名 小島 大輔、深田 吉孝	4. 巻 73
2. 論文標題 特集「目」の神経学 概日リズムを位相制御する光受容体	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 1193～1199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1416201917	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mano Hiroaki, Asaoka Yoichi, Kojima Daisuke, Fukada Yoshitaka	4. 巻 2
2. 論文標題 Brain-specific homeobox Bsx specifies identity of pineal gland between serially homologous photoreceptive organs in zebrafish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0613-1	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28件（うち招待講演 6件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Daisuke Kojima, Naoki Kimata, Masaki Torii, Shodai Tanaka, Shoichi Suenaga, Harumi Nakao, Michinori Koebis, Atsu Aiba, Yoshitaka Fukada
2. 発表標題 Behavioral analyses of light signaling pathways in intrinsically photosensitive-retinal ganglion cells of mice.
3. 学会等名 FASEB Summer Research Conference: The Biology and Chemistry of Vision（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹前和彦、小島大輔
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ仔魚の背地適応を制御する2種類のメラノプシンの役割
3. 学会等名 第23回日本光生物学協会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹前和彦、小島大輔
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ仔魚の背地適応におけるメラノプシンの役割
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuhiko Takemae, Daisuke Kojima
2. 発表標題 Differential roles of melanopsins in regulating background adaptation in zebrafish larvae.
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第45回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹前和彦、小島大輔
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ仔魚の背地適応におけるメラノプシン群の役割
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第76回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川洋平、白木知也、深田吉孝、小島大輔
2. 発表標題 青色感受性の錐体視細胞のアイデンティティを決定する転写因子Foxq2
3. 学会等名 第22回日本光生物学協会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 春井佑希、木股直規、小島大輔
2. 発表標題 新生仔マウスの行動における光依存的な変化
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木股直規、鳥居雅樹、田中翔大、末長祥一、中尾晴美、饗場篤、小島大輔、深田吉孝
2. 発表標題 マウス光感受性網膜神経節細胞における新規光シグナル経路の機能解析
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹前和彦、小島大輔
2. 発表標題 ゼブラフィッシュのメラノプシン発現ニューロンへの遺伝子発現誘導
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daisuke Kojima, Naoki Kimata, Masaki Torii, Shodai Tanaka, Shoichi Suenaga, Harumi Nakao, Michinori Koebis, Atsu Aiba, Yoshitaka Fukada
2. 発表標題 Physiological analyses of the novel signaling pathway in intrinsically photosensitive-retinal ganglion cells of mice
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第44回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhiko Takemae, Daisuke Kojima
2. 発表標題 Generation of the transgenic line to elucidate the melanopsin-expressing retinal circuit regulating the background adaptation in zebrafish
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第44回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daisuke Kojima
2. 発表標題 Functional roles of retinal photoreceptors in non-visual physiologies of vertebrates
3. 学会等名 The 19th International Conference on Retinal Proteins (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木股直規、鳥居雅樹、田中翔大、末長祥一、中尾晴美、饗場篤、小島大輔、深田吉孝
2. 発表標題 Functional analyses of physiological outputs of G-protein signaling pathways in intrinsically photosensitive-retinal ganglion cells.
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第43回大会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 小川洋平、白木知也、深田吉孝、小島大輔
2. 発表標題 Foxq2 determines blue cone identity in zebrafish.
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第43回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹前 和彦、深田 吉孝、小島 大輔
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの背地適応におけるメラノブシン発現双極細胞の役割
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuhiko Takemae, Yoshitaka Fukada, Daisuke Kojima
2. 発表標題 Transgenic approach to the retinal circuit regulating background adaptation in zebrafish
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第42回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Kojima, Yurika Ito, Yoshitaka Fukada
2. 発表標題 Action spectrum for light-induced darkening of body color in larval zebrafish
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第42回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Kojima
2. 発表標題 Retinal photoreceptors regulating body color change in zebrafish
3. 学会等名 The 10th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Kojima
2. 発表標題 Physiological function of non-classical photoreceptors in vertebrate retina: Retinal photoreceptors regulating light-induced body color changes in zebrafish
3. 学会等名 17th Congress of the International Union of Photobiology and 18th Congress of the European Society for Photobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島大輔
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの2種類の体色変化を制御する光受容体
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島大輔
2. 発表標題 第三の眼：松果体における遺伝子発現と発生を制御する転写因子
3. 学会等名 異分野融合による次世代光生物学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Mano, Yoichi Asaoka, Yoshitaka Fukada, Daisuke Kojima
2. 発表標題 Brain-specific homeobox Bsx determines the pineal specificity among zebrafish photoreceptor neurons
3. 学会等名 FASEB SRC: The Biology and Chemistry of Vision (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島大輔、伊藤百合香、深田吉孝
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ幼生初期の体色変化における光作用スペクトル
3. 学会等名 異分野融合による次世代光生物学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Kojima, Hiroaki Mano, Yoichi Asaoka, Yoshitaka Fukada
2. 発表標題 A transcription factor Bsx acts as the molecular switch determining the pineal versus retinal specificities in zebrafish
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第41回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiko Takemae, Kotaro Shibayama, Yoshitaka Fukada, Daisuke Kojima
2. 発表標題 Neural connection of photoreceptor cells regulating background adaptation in zebrafish
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第41回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹前 和彦、柴山康太郎、深田吉孝、小島大輔
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの背地適応を制御する網膜神経回路の組織学的解析
3. 学会等名 第72回動物学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 七田芳則, 小島大輔	4. 発行年 2023年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 152
3. 書名 視覚のしくみ(化学の要点シリーズ)	

1. 著者名 Daisuke Kojima、ほか多数	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 429
3. 書名 Neuromethods 186: Circadian Clocks	

1. 著者名 小島 大輔、ほか多数	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 772
3. 書名 動物の事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap (小島大輔)  
[https://researchmap.jp/daisuke\\_kojima/](https://researchmap.jp/daisuke_kojima/)  
東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻 神経機能生化学研究室  
<https://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~neurobiochem/index.html>  
青色センサー遺伝子の制御メカニズム~脊椎動物の色覚の起源に迫る~  
<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2021/7529/>  
第三の眼：松果体における遺伝子発現と発生を制御する分子  
[https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/z0508\\_00025.html](https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/z0508_00025.html)

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------