

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20770057  
 研究課題名 (和文) 視覚以外で機能するロドプシン類の分子レベルおよび神経レベルの機能解析  
 研究課題名 (英文) Functional analyses of rhodopsin-related non-visual photopigments at molecular and neural levels.  
 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・講師  
 研究者番号：30379276

研究成果の概要 (和文)：動物は光を視覚以外の目的に使っていることが知られており、近年、その仕組みや役割が注目されている。本研究の目的は、視覚以外の光受容について分子レベルから神経レベルまでの機能解析を行い、将来の生理機能解析への手がかりを得ることである。その研究成果として、松果体で機能するパラピノプシンを中心に、視覚以外で機能すると考えられているロドプシン類の分子特性の解明、さらに発現分布や神経ネットワーク解析のためのトランスジェニックゼブラフィッシュの作製に成功した。

研究成果の概要 (英文)：Many animals sense light signals for visual and non-visual functions. On the contrary to the vision, which has been well investigated, the neural mechanism and physiological role of non-visual photoreception are largely unknown. In this study, we focused on some non-visual photopigments and investigated the molecular and neural mechanism of the non-visual photoreceptions by using mammalian cell expression system and transgenic technique. As results, we succeeded to establish several transgenic zebrafish lines for future studies on non-visual photoreception.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：ロドプシン・眼外光受容・松果体・ゼブラフィッシュ

## 1. 研究開始当初の背景

光は動物にとって重要な刺激の一つであり、光受容の生理的役割としては、視覚や概日リズムの光調節がよく知られている。光を受容するシステムの中で最初に光をキャッチする分子がロドプシンおよびその類似光

受容タンパク質 (以後ロドプシン類と表記) である。ロドプシン類は、単に光受容の入り口に位置するだけでなく、どのような波長の光を吸収するのか、どのような細胞応答を引き起こすかの大部分を規定するので、その性質の多様性が生理機能の多様性の基盤とな

っている。近年、ゲノム解読などによって様々な動物の全ロドプシン類遺伝子が決定された結果、これまでに想像されていた数をはるかに超えるロドプシン類が見出された。最も顕著なのは硬骨魚類で、ゲノム中に 20 を超えるロドプシン類遺伝子が存在し、そのうち生理機能との関連がわかっているものはわずか 10 個であり、大半がその生理的役割が不明となっている。このことは、動物にはこれら機能未知ロドプシン類が担う未解明の光作用性の生理機能が存在することを強く示唆している。

## 2. 研究の目的

これまでに私たちは、動物培養細胞発現系を用いて、松果体の UV 受容タンパク質であるパラピノプシン、哺乳類において概日リズムの光受容体であるメラノプシンおよび肝臓などでの発現もみられる TMT オプシンなど、視覚以外の機能に関わると考えられているロドプシン類の培養細胞での発現に成功した。そこで本研究では、これら“視覚外”ロドプシン類の分子特性の解明およびその特性と生理機能との橋渡しを目指し、多数のロドプシン類を持ち、遺伝子操作が可能なゼブラフィッシュを材料に、上記ロドプシン類の分子レベルから神経レベルまでの機能解析を試みた。

## 3. 研究の方法

本研究では、上述のパラピノプシン、メラノプシン、TMT オプシンについて、分子レベルから神経レベルまでの機能解析を行った。具体的には、①遺伝子（ゼブラフィッシュホモログ）の単離、培養細胞での発現、生化学的・分光学的解析を行い、各ロドプシン類の波長感受性、光反応特性といった分子特性を明らかにする。②定量的 PCR や免疫組織化学的解析によって、各ロドプシン類が機能する光受容細胞の分布を明らかにする。③各ロドプシン類について発現を誘導するプロモーター領域を同定し、そのコントロール下で GFP を発現するトランスジェニック (Tg)ゼブラフィッシュを用いて光受容細胞の詳細な分布や神経ネットワークを解析する。また、将来の機能解析に有用な Tg ゼブラフィッシュを作製する。

## 4. 研究成果

(1)ゼブラフィッシュ視覚外ロドプシン類の機能解析

①分光学的性質の解析：視覚以外の機能に関わると考えられているロドプシン類（パラピノプシン、メラノプシン、TMT オプシン）のゼブラフィッシュホモログを単離し、動物培養細胞発現系を用いて、分光学的解析を試みた。その結果、ゼブラフィッシュの 2 種のパ

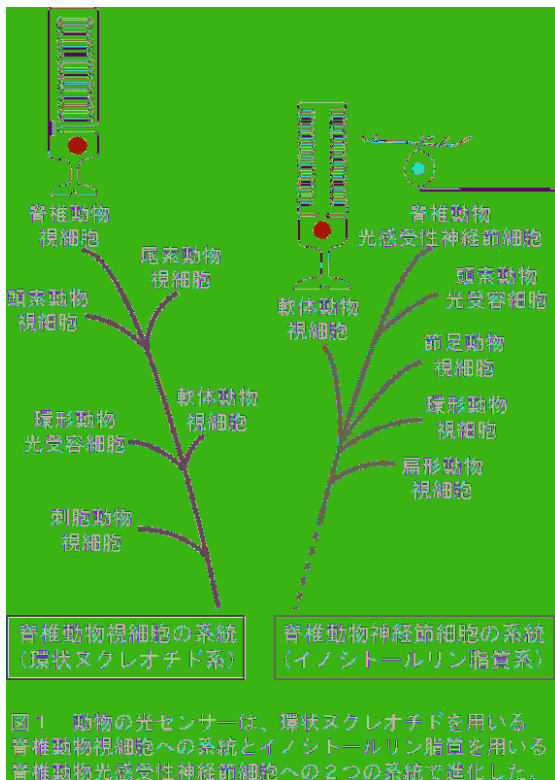
ラピノプシンと 2 種類メラノプシンについて解析に成功した。解析の結果、パラピノプシン、メラノプシンとも、吸収波長域が異なるパラログが存在することがわかり、特に、パラピノプシンについては、一方が従来通り UV 受容体であるのに対し、もう一方は緑色受容体と大きくことなる波長域、すなわち色に感受性があることがわかった。

②発現分布の解析：2 種類のパラピノプシンの発現部位を調べるために、定量的 PCR および作製した各パラピノプシン特異的抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った。その結果、2 種類のパラピノプシンの発現は、ゼブラフィッシュ松果体の前方部分のみに見られ、それぞれのパラピノプシン細胞が近接した別々の細胞に局在していることが明らかとなった。この結果は、UV 感受性パラピノプシンと緑感受性パラピノプシンの光情報が相互作用していることを強く示唆しており、現象としては古くから知られていた松果体における“色識別”に関わっている可能性を示唆している。

③トランスジェニック (Tg) ゼブラフィッシュの作製：2 種類のパラピノプシン発現の詳細な分布と将来の生理機能解析のために、2 種類のパラピノプシン発現細胞をそれぞれターゲットするプロモーター領域を取得し、レポーターである GFP を連結して遺伝子導入したところ、それぞれについて松果体で特異的に GFP シグナルを発する Tg 系統を得た。また、取得したプロモーター下に酵母の転写因子である GAL4 を発現させる GAL4-Tg ゼブラフィッシュを作製した。GAL4 は UAS 配を認識しその下流の遺伝子の発現を促進するので、GAL4-Tg フィッシュと UAS 下流に毒素遺伝子をもつ Tg フィッシュと交配させることで、パラピノプシン発現細胞を選択的に失活させた Tg フィッシュを得ることができ、将来の機能解析に有用である。

(2)クラゲの視覚系で機能する新奇ロドプシン類の発見

ロドプシン類の分子特性の比較解析の過程で、眼を持つ最も原始的な動物であるアンドンクラゲの視覚で機能する新奇ロドプシン類を同定した。興味深いことに組織学的、生化学的解析の結果、アンドンクラゲのロドプシンは、これまでロドプシン類では見つかっていなかった、Gs 型 G タンパク質と共役し、光依存的に細胞内 cAMP 濃度を上昇させる性質を持つことを明らかにした（雑誌論文 3：Koyanagi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105 2008）。さらにこの発見から、「動物の光受容細胞は、脊椎動物の視細胞に至る系統と光感受性網膜神経節細胞に至る系統の 2 つの系統で進化した」という光受容細胞進化のシナリオを提唱するに至った（図 1）。



#### 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4件)

1. T. Nagata, M. Koyanagi, H. Tsukamoto, A. Terakita: Identification and characterization of a protostome homologue of peropsin from a jumping spider. *J. Comp. Physiol. A* 196, 51-59 (2010) 査読あり
2. 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 (31), 20676-20683 (2009) 査読あり
3. 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 (40), 15576-15580 (2008) \*責任著者 査読あり
4. M. Koyanagi and A. Terakita: Gq-coupled rhodopsin subfamily composed of invertebrate visual pigment and melanopsin. *Photochem. Photobiol.* 84, 1024-1030 (2008) 査読あり

[学会発表] (計31件)

(1) 招待講演等

①国際学会等

1. 小柳光正 : Diverged members of rhodopsin

family - molecular properties and functions. II - A new member from jellyfish. 13th Congress of the European Society for Photobiology (プロツワフ/ポーランド) 2009年9月9日

2. 小柳光正 : Diversity and evolution of the animal phototransduction cascade. 4th Asia and Oceania Conference on Photobiology (バラナシ/インド) 2008年11月25日

②国内学会等

3. 小柳光正 : 多様なロドプシン類の性質と光スイッチへの適性 生理学研究所研究会「光を用いた神経活動の操作」(岡崎) 2009年9月3日

(2) 一般発表等

①国際学会等

4. 小柳光正、高野浩輔、塚本寿夫、大津浩三、徳永史生、寺北明久 : Jellyfish visual signaling and its evolutionary implications. International Symposium on Marine Genomics (沖縄) 2009年12月16日
5. 永田崇、小柳光正、塚本寿夫、磯野邦夫、蟻川謙太郎、寺北明久 : Molecular basis and evolution of jumping spider vision with retina containing four-layered photoreceptors. 13th Congress of the European Society for Photobiology (プロツワフ/ポーランド) 2009年9月7日
6. 小柳光正、高野浩輔、塚本寿夫、大津浩三、徳永史生、寺北明久 : Gs-mediated phototransduction cascade in jellyfish eye and its evolutionary implications. FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCE 2009 (スノーマス/アメリカ合衆国) 2009年6月16日
7. 塚本寿夫、David Farrens、小柳光正、寺北明 : Comparative study on conformational changes of rhodopsins having functionally varied properties using site-directed fluorescence labeling. FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCE 2009 (スノーマス/アメリカ合衆国) 2009年6月16日

②国内学会等

8. 小柳光正・和田清二・山下(川野)絵美・寺北明久(大阪市大・院理・生物地球) : ゼブラフィッシュ松果体における2種類のパラピノプシンの分布 第34回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第31回大会合同大会(大阪) 2009年10月23日
9. 塚本寿夫、David Farrens、小柳光正、寺北明久 : 脊椎動物の視物質と非視物質パラピノプシンのG蛋白質活性化能の比較 第34回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第31回大会合同大会(大阪) 2009年10月23日

10. 山下 (川野) 絵美、小柳光正、七田芳則、大石正、保智己、寺北明久：ヤツメウナギ松果体光受容細胞で機能する 2 種類のアレスチンの役割 第 34 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 31 回大会合同大会 (大阪) 2009 年 10 月 23 日
11. 永田崇、小柳光正、塚本寿夫、磯野邦夫、蟻川謙太郎、寺北明久：ハエトリグモ主眼の 4 層構造をなす視細胞で機能する視物質の吸収特性 第 34 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 31 回大会合同大会 (大阪) 2009 年 10 月 23 日
12. 若桑基博、小柳光正、寺北明久、七田芳則、蟻川謙太郎：モンシロチョウ青視物質 2 種の波長制御に関わるアミノ酸残基の同定 第 34 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 31 回大会合同大会 (大阪) 2009 年 10 月 23 日
13. 小柳光正、永田崇、塚本寿夫、磯野邦夫、蟻川謙太郎、寺北明久：4 層構造の網膜が関与するハエトリグモの視覚の分子基盤 日本動物学会第 80 回大会 (静岡) 2009 年 9 月 19 日
14. 山下 (川野) 絵美、小柳光正、七田芳則、大石正、保智己、寺北明久：パラピノプシンが機能する松果体紫外光受容細胞でのアレスチンの役割 日本動物学会第 80 回大会 (静岡) 2009 年 9 月 19 日
15. 神野有香、塚本寿夫、山下 (川野) 絵美、小柳光正、七田芳則、寺北明久：硬骨魚類に存在する複数のメラノプシンの生化学的性質の比較解析 日本動物学会第 80 回大会 (静岡) 2009 年 9 月 19 日
16. 和田清二、山下 (川野) 絵美、小柳光正、寺北明久：ゼブラフィッシュ松果体におけるパラピノプシンの組織化学的解析 日本動物学会第 80 回大会 (静岡) 2009 年 9 月 19 日
17. 本多隼人、永田崇、小柳光正、寺北明久：ハマダラカにおける機能未知の光受容タンパク質エンセファロプシンの組織化学的解析 日本動物学会第 80 回大会 (静岡) 2009 年 9 月 19 日
18. 小柳光正、高野浩輔、塚本寿夫、大津浩三、徳永史生、寺北明久：二胚葉動物に存在する光シグナル伝達系の解明と動物の光シグナル伝達系の進化 第 11 回日本進化学会大会 (札幌) 2009 年 9 月 3 日
19. 加藤ひろみ、小柳光正、山下 (川野) 絵美、塚本寿夫、寺北明久：眼外のような組織で発現が認められるロドプシン類・エンセファロプシンの機能解析 第 11 回日本進化学会大会 (札幌) 2009 年 9 月 3 日
20. 山下 (川野) 絵美、小柳光正、保智己、大石正、七田芳則、寺北明久：光再生能を持つ光受容タンパク質パラピノプシンと共役するアレスチンの同定とその機能解析 第 15 回日本光生物学協会年会 (岡崎) 2009 年 8 月 20 日
21. 藤田彩理、山下高廣、今元泰、小柳光正、寺北明久、七田芳則：オールトランスレチナルを発色団にもつオプシン、ペロプシンとレチノクロムの光反応の比較 日本生物物理学会第 46 回年会 (福岡) 2008 年 12 月 3 日
22. 小柳光正、高野浩輔、塚本寿夫、大津浩三、徳永史生、寺北明久：アンドクラグの視細胞で機能する光情報伝達系の解析 日本動物学会第 79 回大会 (福岡) 2008 年 9 月 5 日
23. 高田英一郎、小柳光正、塚本寿夫、徳永史生、寺北明久：脊椎動物ロドプシンと近縁なエンセファロプシンの分子特性の生化学的解析 日本動物学会第 79 回大会 (福岡) 2008 年 9 月 5 日
24. 山下 (川野) 絵美、保智己、小柳光正、大石正、七田芳則、寺北明久：ヤツメウナギの松果体 UV 光受容細胞でパラピノプシンと共局在するアレスチンの同定 日本動物学会第 79 回大会 (福岡) 2008 年 9 月 5 日
25. 永田崇、小柳光正、塚本寿夫、徳永史生、寺北明久：ハエトリグモに存在する視物質様タンパク質 日本動物学会第 79 回大会 (福岡) 2008 年 9 月 5 日
26. 和田清二、山下 (川野) 絵美、小柳光正、寺北明久：爬虫類グリーンイグアナに存在する紫外光受容タンパク質の同定 日本動物学会第 79 回大会 (福岡) 2008 年 9 月 5 日
27. 神野有香、小柳光正、高田英一郎、塚本寿夫、川野 (山下) 絵美、七田芳則、寺北明久：硬骨魚類に存在する多様なメラノプシンの比較解析 日本動物学会第 79 回大会 (福岡) 2008 年 9 月 5 日
28. 若桑基博、小柳光正、寺北明久、七田芳則、蟻川謙太郎：モンシロチョウ短波長受容型視物質 2 種の培養細胞系での発現 日本動物学会第 79 回大会 (福岡) 2008 年 9 月 5 日
29. 高田英一郎、小柳光正、塚本寿夫、徳永史生、寺北明久：機能未知なロドプシン類似タンパク質エンセファロプシンの性状解析 日本比較生理生化学会第 30 回大会 (札幌) 2008 年 7 月 19 日
30. 永田崇、小柳光正、磯野邦夫、山下茂樹、徳永史生、蟻川謙太郎、寺北明久：ハエトリグモ副眼の視物質の解析 日本比較生理生化学会第 30 回大会 (札幌) 2008 年 7 月 21 日
31. 永田崇、小柳光正、磯野邦夫、山下茂樹、徳永史生、蟻川謙太郎、寺北明久：ハエトリグモの後中眼網膜において特異的に発現する視物質 日本動物学会近畿支部研究発

表会（京都）2008年5月24日

〔図書〕（計3件）

1. 小柳光正：進化（Evolution／Cold Spring Harbor Laboratory Press）第2章 pp.41-71  
（翻訳）メディカル・サイエンス・インターナショナル（2009）
2. 小柳光正：光センサーの進化 日本比較生理生化学会編「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」 pp.22-31. 共立出版（2009）
3. 小柳光正：好火性甲虫の赤外線受容：非冷却赤外線センサーへの応用（翻訳）「昆虫ミメティックス～昆虫の設計に学ぶ～」 pp.208-214. エヌ・ティー・エス（2008）

#### 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・講師  
研究者番号：30379276

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし