

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06737

研究課題名（和文）マウスモデルと数理モデルを利用した視覚二元説の解明へ向けた構成的アプローチ

研究課題名（英文）A constructive approach for duplex vision using mathematical and mouse models.

研究代表者

櫻井 啓輔（Sakurai, Keisuke）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：20647317

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脊椎動物の網膜に存在する桿体視細胞と錐体視細胞は、それぞれ暗所視と明所視を担っており、働く光環境に合わせて光感度や応答速度が異なる。これらの光応答特性の違いに両視細胞に存在する光シグナル伝達経路がどのように関与するか明らかにするため、（1）円錐タイプのロドプシン（2）ロドプシン様の錐体オプシン（3）錐体関連の小口病マウスモデルを構築し、電気生理学的に解析を行った。ロドプシングループで保存されている残基は桿体の光感度に、錐体オプシングループで保存されている残基は錐体の応答速度に関与することが分かった。小口病マウスモデルから錐体関連小口病の新規の発症機序を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで小口病のマウスモデルは、原因遺伝子ノックアウトマウスが用いられてきた。しかし、ノックアウトマウスは桿体の異常に関してはいいモデルであるが、ヒト錐体の光応答の回復に異常がみられる症例について説明できなかった。本研究において作出した錐体関連の小口病マウスモデルから、ヒト錐体の回復異常に発症に関する新規の機序を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：In vertebrate retina, rod and cone photoreceptors are responsible for scotopic and photopic vision, respectively. The light sensitivity and kinetics of the photoreceptors differ depending on their vision. To elucidate the relationship between photoresponse properties and the phototransduction cascades in both photoreceptor cells, we created three mouse models of (1) cyclostrom-type rhodopsin (2) rhodopsin-like cone opsin (3) cone-associated Oguchi disease. We found that the conserved residues in rhodopsin group were involved in the light sensitivity of rods, while the residue conserved in cone opsins were involved in the cone response kinetics. Also, we proposed a novel mechanism that causes the cone-associated Oguchi disease.

研究分野：動物生理学

キーワード：視細胞 網膜 オプシン 小口病 ノックインマウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は、暗い所での視覚(暗所視)を司る桿体視細胞と明るい所での視覚(明所視)を司る錐体視細胞という二種類の視細胞により外界の光情報を得ている。暗所での視覚を担う桿体視細胞は、僅か1光子量子シグナル情報を検知するために、高いシグナル/ノイズ(S/N)比で光シグナルを神経性情報へと変換する機構を備えている。光受容タンパク質であるオプシンは、光による活性化だけではなく熱エネルギーによっても自発的に活性化するため、これが暗時においてノイズを発生させ、視細胞のS/N比を低下させる。したがって、視細胞が示す低い暗ノイズ特性の実現には、桿体ロドプシンが示す高い熱安定性が重要な要因となる。一方で、シグナル伝達の増幅率は桿体が錐体に比べて高効率であり、オプシンが僅か1分子反応しただけで十分な大きな応答を示す。

先行研究では、桿体視細胞におけるシグナル伝達タンパク質を錐体型に置換した遺伝子改変モデルマウスにより、桿体視細胞におけるシグナル伝達タンパク質群の機能が明らかになった。一方で、錐体オプシン特有の性質である活性中間体の速い崩壊や熱的不安定性が、錐体視細胞の中でどのような生理的意義を担うのかは不明である。

本研究では、ゲノム編集技術を利用して遺伝子改変マウスモデルを作出しその生理学的特性を解析することで、視細胞の光シグナル伝達機構関連タンパク質の役割を理解することを目指した。

### 2. 研究の目的

#### (1) 暗所視に関連するロドプシンのアミノ酸残基の生理学的検証

円口類ヤツメウナギの網膜にも他の脊椎動物と同様に桿体視細胞と錐体視細胞が存在することから、視細胞の機能分化は脊椎動物の共通祖先で獲得された形質だと考えられる。しかし、ヤツメウナギ桿体視細胞のロドプシンは、顎口類のロドプシンと異なりその分子的性質が錐体オプシンに類似していることが知られている。ヤツメウナギロドプシンの光活性中間体や暗時の熱安定性は、顎口類のロドプシンと比較して低く、これらの性質の違いは、円口類と顎口類のロドプシンにおける189番目のアミノ酸残基の違いによることが先行研究で示された。この残基は円口類ではプロリン残基が保存されており、顎口類ではイソロイシン残基が進化的に保存されていることから、生理学的に重要な役割を担っていると推察されるが、具体的にどのような視覚機能に関与するかは不明である。そこで、この残基が担う分子的特性の違いが、脊椎動物の視覚にどのように寄与するのかを生理学的に明らかにするため、マウスモデルの作出を行い電生理学的に調べた。

#### (2) 錐体オプシンの光反応速度と錐体の光応答・順応の関連解析

暗所視を担う桿体は微弱光に対して感受性を示すのに対し、明所視を担う錐体は強い光に対しても飽和せず光受容能を示す。両視細胞に発現するロドプシンと錐体オプシンは異なる光反応速度を示すことから、これらの視細胞の機能との関連が示唆されている。すなわち、錐体オプシンはロドプシンに比べて光中間体の反応速度やオプシンのレチナルの再生速度が速い性質をもつため、錐体視細胞が明所でも光飽和することなく光受容能を示すと考えられる。本研究では、オプシンの分子特性が錐体視細胞のどの視覚機能と関連するのかを検証する為に、ロドプシン様の特性もつ錐体オプシン変異体を発現するマウスを作製しその生理機能解析を行った。マウス緑錐体オプシンの200番目のプロリン残基をイソロイシン残基に置換すると、ロドプシン様の特性を示すことが知られている。そこで、CRISPR-Cas9によるゲノム編集を用いて、200番目の残基を置換したマウス緑錐体オプシン変異体(mGr<sup>P200I</sup>)が発現するノックイン(KI)マウスの作出を行った。

#### (3) 錐体関連小口病モデルマウスの解析

視物質の不活性化の機構は、Gタンパク質受容体キナーゼ1(GRK1)によりリン酸化を受け部分的に活性が抑制され、その後アレスチンと結合することで完全に抑制される。ヒトのGRK1遺伝子が原因で起きる小口病は、通常は桿体の回復に異常がみられ、錐体機能は正常である。これは、桿体ではGRK1のみ発現するのに対して、錐体ではGRK1とGRK7が共発現しているため、GRK1が機能不全でもGRK7により機能補償されるためと考えられている。しかし例外的に、GRK1<sup>P391H</sup>変異のみ、桿体だけでなく錐体の回復に異常を示すことが報告されている。この原因を明らかにする為に、GRK1<sup>P391H</sup>モデルマウスを作出し電気生理学的に調べた。

### 3. 研究の方法

マウスの遺伝子組換え体は経卵管ゲノム編集技術であるi-GONAD法を用いた。この手法を用いて、ロドプシン、錐体オプシン、Grk1遺伝子のノックインマウスを作出した。これらに加えて、桿体トランスデュースン(Gnat1)、グアニル酸シクラーゼ活性化蛋白質(GCAPs)、Gタンパク質受容体キナーゼ1(Grk1)、緑錐体オプシン(OPN1mw)の遺伝子ノックアウトマウスを作出した。電気生理学的手法は、網膜における光応答を調べるために、網膜電図(ERG)の測定系を確立した。また、単一視細胞の光応答の測定は、吸引電極法を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 暗所視に関連するロドプシンのアミノ酸残基の生理学的検証

ゲノム編集法によりマウスのロドプシン遺伝子の **189** 番目のイソロイシン残基を円口類がもつプロリン残基に置換した組換え体を作成した (図 1A)。網膜の光応答特性を調べるために、暗順応させたマウス個体の網膜電図 (ERG) 記録を行った。視細胞由来の **a** 波や双極細胞由来の **b** 波は、野生型とホモ接合体で同程度の振幅の大きさを示したが、光感度はホモ接合体の方が野生型に比べて低下を示した (図 1B, C)。次に、視細胞の光応答特性を調べるために、吸引電極法を用いて視細胞外節の電流を測定した。光刺激応答曲線から求めた光感度の平均値は、野生型で **32 photons/μm<sup>2</sup> (n = 5)** ホモ接合体は **54 photons/μm<sup>2</sup> (n = 4)** となり野生型に比べて **1.6** 倍光感度が低下し、網膜電図での結果と同様の傾向が得られた。

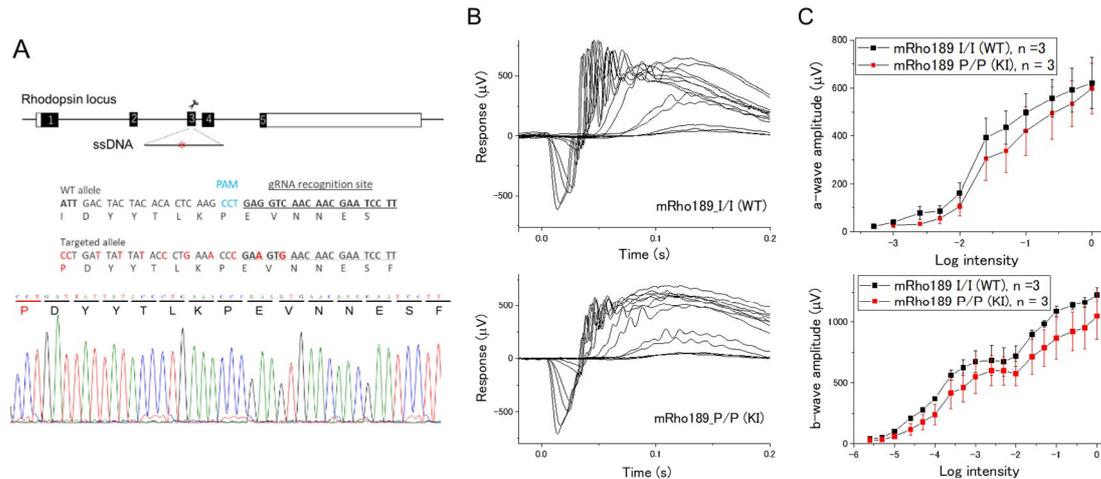


図 1 A. ロドプシン遺伝子座の189番目のイソロイシン残基 (I) をコードする配列をプロリン残基 (P) に置換した。B. 野生型 (上段) とノックインマウス (下段) におけるフラッシュ光刺激によるERG応答。光刺激後に負方向に出る応答がa波、続いて正方向に出る応答がb波。C. フラッシュ光の強度に対するa波 (上段) とb波 (下段) の振幅の関係。

### (2) 錐体オプシンの光反応速度と錐体の光応答・順応の連関解析

ゲノム編集法を用いて緑錐体オプシン遺伝子の **200** 番目のプロリン残基をイソロイシンに置換したノックインマウス **mGr<sup>P200I-ATC</sup>** を作成した (図 2A)。ERG によりマウス網膜にフラッシュ光刺激を与えて光応答を測定したところ、**a** 波や **b** 波の振幅は野生型とノックインマウスで有意な差は認められなかった。このことから、緑錐体オプシン変異体は、錐体視細胞で視物質として機能し光感度には影響しないと考えられる。次に、網膜に様々な周波数のフリッカー光刺激を与えたところ、錐体視細胞が特異的に反応を示す、**5 kHz** 以上の高周波刺激に対して、野生型に比べてノックインマウスは振幅の減衰を示した (図 2B, C)。この結果から、錐体オプシン変異体の影響により、視細胞の光応答の回復が遅延したと考えられた。これまで、錐体視細胞の光応答の回復は、キナーゼやアレスチンによる視物質の不活性化に依存すると考えられてきたが、視物質の光反応特性も重要な要因であることが本研究により明らかとなった。

図 2 A. 緑錐体オプシン遺伝子座の200番目のプロリン残基をイソロイシン残基 (I) をコードする配列に置換した。B. 野生型 (WT)、ノックインマウス (*mGr<sup>P200I-ATC</sup>*)、ノックアウトマウス (*mGr KO*) における、様々な周波数のフリッカー光に対する光応答。C. フリッカー光による光応答の振幅を周波数に対してプロットした。錐体が特異的に反応する5 Hzより高周波で野生型に比べてノックインは速く減衰している。

### (3) 錐体関連小口病マウスモデルの解析

小口病のモデルマウスである **Grk1<sup>P391H</sup>** ノックインマウスを作成した(図3A)。ウェスタンブロッティングで網膜における **GRK1** の発現量を調べたところ、野生型もホモ接合体も同様の発現レベルを示した。このことから、この変異は **GRK1** タンパク質の安定性に影響しないと考えられる。次に、光応答の回復過程への影響を調べる為に、桿体の単一視細胞記録をおこなったところ、ホモ接合体 (**Grk1<sup>H/H</sup>**) は野生型に比べ著しい遅延を示した(図3B, C)。このことから、**GRK1<sup>P391H</sup>** 変異体は、視物質に対するリン酸化能が欠失していると考えられる。興味深いことに、ノックインのヘテロ接合体 (**Grk1<sup>+/H</sup>**) は、**GRK1** ノックアウトヘテロ接合体 (**Grk1<sup>+/-</sup>**) と比較しても光応答の回復に遅延がみられた(図3D)。この結果は **GRK1<sup>P391H</sup>** 変異体が野生型 **GRK1** と共発現している場合、**GRK1<sup>P391H</sup>** 変異体が野生型 **GRK1** による視物質のリン酸化反応を阻害する可能性を示唆している。**GRK1** と **GRK7** が共発現しているヒト錐体においては、**GRK1<sup>P391H</sup>** 変異体が **GRK7** による視物質のリン酸化反応を阻害し、錐体の回復の遅延を引き起こすと推察される。

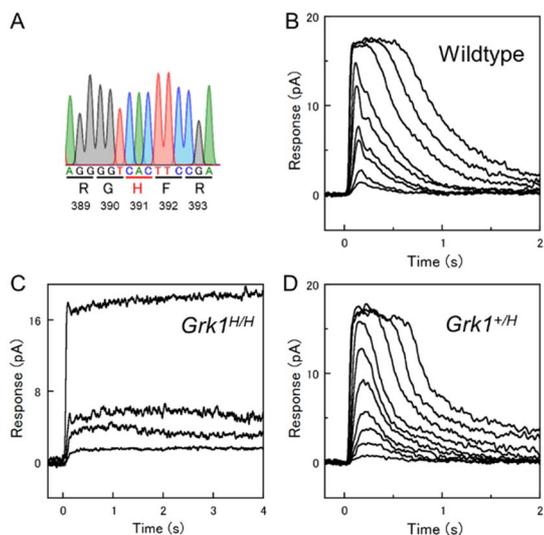


図3 A. GRK1遺伝子座の391番目のプロリン残基をヒスチジン残基(H)に置換した。B. 野生型 C. ホモ接合体 D. ヘテロ接合体の桿体の単一視細胞光応答

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

|   |                              |
|---|------------------------------|
| 1. 著者名<br>Hozumi Akiko, Matsunobu Shohei, Mita Kaoru, Treen Nicholas, Sugihara Takaho, Horie Takeo, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Shiraishi Akira, Hamada Mayuko, Satoh Noriyuki, Sakurai Keisuke, Satake Honoo, Sasakura Yasunori | 4. 巻<br>30                   |
| 2. 論文標題<br>GABA-Induced GnRH Release Triggers Chordate Metamorphosis  | 5. 発行年<br>2020年              |
| 3. 雑誌名<br>Current Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>1555 ~ 1561.e4 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.cub.2020.02.003   | 査読の有無<br>有                   |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                 |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>佐藤 慎哉、櫻井啓輔                     |
| 2. 発表標題<br>網膜の光応答を測定する ex vivo ERG 測定系の構築 |
| 3. 学会等名<br>日本動物学会                         |
| 4. 発表年<br>2020年                           |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>武生朋佳, 徐茵茵、櫻井啓輔                  |
| 2. 発表標題<br>ロドプシン様の特性を示す錐体オプシンノックインマウス作製の試み |
| 3. 学会等名<br>日本動物学会                          |
| 4. 発表年<br>2022年                            |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Keisuke Sakurai, Yinyin Xu                                     |
| 2. 発表標題<br>Physiological role of the cone opsin properties in cone vision |
| 3. 学会等名<br>第19回レチナル蛋白質国際会議（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Cheng-Han Yu, Chii-Shen Yang, Keisuke Sakurai  |
| 2. 発表標題<br>The contribution of two structural regions to the acid tolerance of bacteriorhodopsin from Haloquadratum walsbyi |
| 3. 学会等名<br>第19回レチナル蛋白質国際会議（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2022年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |  |  |  |
|---------|---------|--|--|--|
|         |         |  |  |  |