

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08885

研究課題名(和文) 魚類下垂体がもつ光受容能の分子機構の解明、その応用による内分泌系光操作技術の開発

研究課題名(英文) Molecular mechanism of photoreception in the fish pituitary

研究代表者

佐藤 恵太 (Sato, Keita)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：80725622

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)：脳の下部に位置する下垂体は脊椎動物が持つ重要な内分泌器官である。小型魚類メダカを用いた実験により、下垂体のメラニン細胞刺激ホルモン(MSH)を産生する細胞には動物が視覚に用いるものと類似した光受容体「Opn5m」が発現していることがわかった。またMSH産生細胞は、Opn5mを用いることで直接紫外光を感じ取り、ホルモンの放出量を調節する機能を持っていることがわかった。さらにOpn5mを他の細胞に遺伝子導入して光を当てると、細胞内のカルシウム濃度を上昇させる事ができ、細胞の振る舞いを光で操作するツールとして利用できる可能性があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レンズを持つ目や脳表にある松果体のように光受容に特化した組織でなく、内分泌機能の中核と考えられ、実際ホルモン産生細胞の塊といえる下垂体において、直接環境光を感知して機能を調節する機構はこれまでに報告のない、新たな概念である。今後、本研究で得られた知見を基盤として生物の内分泌機能を光操作する手法を発展させることで、疾患の新たな治療や、産業動物の新たな育成法の開発などに繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The pituitary gland, located in the lower part of the brain, is an essential endocrine organ in vertebrates. In medaka (*Oryzias latipes*), we have revealed that melanocyte-stimulating hormone (MSH)-producing cells in the pituitary gland express the photoreceptor Opn5m, which is similar to that used in visual photoreception. We showed that MSH-producing cells directly sense ultraviolet light by using Opn5m leading to regulate hormone release. Furthermore, when Opn5m was transfected into other cells and exposed to light, the intracellular calcium concentration could be increased, indicating that Opn5m could be used as a tool to manipulate cell behavior with light.

研究分野：光生物学

キーワード：光受容 下垂体 内分泌 オプシン メラノサイト刺激ホルモン 魚類 ホルモン 非視覚光受容

1. 研究開始当初の背景

微生物に由来する光駆動型のイオン輸送体を神経細胞などに遺伝子導入し、その活動を光で操作して機能解析する手法は光遺伝学と呼ばれ、普及している。一方、遺伝子導入がなくとも、多くの動物は網膜に加え松果体、視床下部、皮膚などに光受容タンパク質「オプシン」を発現しており、これらの組織には内在的に光感受性があると考えられている。動物のオプシンは G タンパク質共役型受容体(GPCR)の一種で、脊椎動物の視物質がその代表である。視物質は暗いときは不活性で、光が当たると構造変化して三量体 G タンパク質を活性化する。動物は視物質だけでなく多様なオプシンを持ち、その分子特性・組織分布もそれぞれに異なる。

小型魚類メダカは飼育が容易で遺伝子操作が可能、またデータベースも整った優れたモデル脊椎動物である。メダカのゲノム上にはオプシンが 34 遺伝子ある。申請者は in situ hybridization (ISH)を用いた網羅的解析により、脊椎動物の主要な内分泌器官である下垂体に、複数のオプシンが発現することを発見した(図1)。また2重ISHにより Opn5m がメラノサイト刺激ホルモン(MSH)産生細胞に、Opn3 がプロラクチン(PRL)産生細胞に発現することを同定、これらの分泌細胞が光感受性である可能性を見出したが、機能は不明確であった。一方、研究分担者は MSH 産生細胞に蛍光カルシウムインジケータを発現するメダカを作製・解析していて、細胞内カルシウム濃度が光で上昇することを見出した。ホルモン産生細胞でのカルシウム上昇はホルモン放出を意味する。よってこれらの知見を組み合わせると、Opn5m がメダカ下垂体 MSH 分泌細胞において光を受容し、細胞内カルシウム濃度を上昇させ、ホルモンを放出するという、重要な光生理応答を担うことを強く示唆する。残り 2 つのオプシンも下垂体内でそれぞれ特徴的な発現パターンを示すため、内分泌に関連した光生理現象に関与する可能性が高い。しかし、これらオプシンがどのように細胞内シグナル伝達系を駆動し、細胞内カルシウム濃度を変動させ、どのホルモンを放出させるか、不明な点が多く残っている。

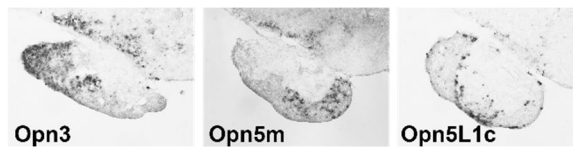


図1 メダカ下垂体オプシン in situ hybridization

2. 研究の目的

メダカ下垂体のホルモン産生細胞に内在する光受容能の生理機能と、細胞内シグナル伝達系を含む分子メカニズムを明らかにする。また逆にこの光受容システムを、内分泌を光で操作するツールとして利用できるかどうか検証する。

3. 研究の方法

Opn5L1c 陽性細胞は、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、成長ホルモン(GH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、PRL、MSH のいずれの産生細胞でもないことが分かっていた。その他の下垂体ホルモン前駆体遺伝子、または濾胞星状細胞マーカーである S100 とのメダカ下垂体における多重蛍光 ISH により、Opn5L1c 陽性細胞の同定を試みた。蛍光 ISH(FISH)の方法として、近年開発された Signal Amplification By Exchanging Reaction(SABER)法を導入して実験を行った。

オプシンが活性化する下流シグナル分子の候補として、メダカゲノム上の三量体 G タンパク質 サブユニット遺伝子を ISH により調べ、メダカ下垂体オプシン発現細胞に共発現する G タンパク質の同定を試みた。

メダカオプシンが実際どの G タンパク質を介してカルシウム応答を惹起するかを決定するため、293T 細胞から、対応関係を調べたい G タンパク質 サブユニットのヒトオソログをノックアウトした細胞株を調製した。オプシンと G タンパク質、および細胞内カルシウムの発光インジケータであるエクオリンを共発現させて発光測定を行うことで、光依存的な細胞内カルシウム濃度変化を捉えた。

単離したメダカ下垂体に人工脳脊髄液中で光照射した後、人工脳脊髄液中に放出されたペプチドホルモンを液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)により検出・定量する方法を開発し、実際にメダカ下垂体が直接光を受容してホルモンを放出していることを検証することを試みた。

LH/FSH 産生細胞由来の細胞株である L T2 を用い、オプシンとエクオリンを共発現させて、光照射による細胞内カルシウム濃度変動を測定する。また光照射で培地へ放出されるホルモンを液体クロマトグラフィー質量分析法で解析する。

4. 研究成果

(1) メダカ下垂体で光受容タンパク質 Opn5L1c を発現する細胞集団の同定

メダカの下垂体において網羅的にホルモン前駆体遺伝子や S100 遺伝子の ISH を行った結果、黄体形成ホルモン(LH)と卵胞刺激ホルモン(FSH)が Opn5L1c に近いパターンを示した。しかし、SABER-FISH 法により Opn5L1c、LH、FSH の mRNA を同時に蛍光検出して観察した結果、Opn5L1c はいずれのホルモン産生細胞にも発現していないことがわかった。Siddique らが 2021 年にメダカ下垂体のシングルセル RNA-seq のデータを公開している。Opn5L1c 自身はこのデータ中では検出されていない(おそらく発現量が低い)ため)が、メダカ下垂体からは既知のホルモン産生細胞と、血球系の細胞(マクロファージ、赤血球)に加えて、既知のホルモン前駆体遺伝子を発現しない 5 つの細胞集団が検出されている。これら 5 つの細胞集団のいずれかに Opn5L1c が発現している可能性が高いと考えられ、今後各細胞集団のマーカー遺伝子を目印として、細胞集団の同定を行っていく予定である。

(2) メダカ下垂体 MSH 産生細胞における紫外光受容タンパク質 Opn5m の機能の解析

まず、新たに導入した SABER-FISH 法によりメダカ下垂体において proopiomelanocortin (pomc, ACTH と MSH の前駆体遺伝子)と Opn5m を多重蛍光検出した結果、MSH 産生細胞のうち 95%以上が Opn5m 陽性であることが明らかとなった。MSH 産生細胞の光応答をホルモンレベルで検出するため、単離したメダカ下垂体に人工脳脊髄液中で短波長光照射し、LC-MS による解析を行った結果、暗状態に保った場合に比べて光を照射した場合、上清から検出される MSH の量が約 2 倍に増加することがわかった。これが Opn5m の光受容によるものかどうか確認するため、Opn5m KO メダカを作製して同様に実験を行った。すると、Opn5m KO メダカでは光依存的に人工脳脊髄液中に放出される MSH が増える現象が見られなかった。陽性対照として、野生型においても Opn5m KO メダカにおいても、副腎皮質ホルモン放出ホルモン(CRH)の添加は MSH の放出量を同様に上昇させる。つまり Opn5m KO においても MSH 産生細胞の MSH 産生・放出という機能は障害されていない。これらの結果は、下垂体の MSH 産生細胞が Opn5m 依存的に光を受容して、MSH を放出することを強く示唆している。

(3) 下垂体オプシンが共役する三量体 G タンパク質サブタイプの探索

メダカゲノム上の三量体 G タンパク質 サブユニット遺伝子をすべてクローニングし、ISH によりメダカ下垂体オプシン発現細胞に共発現する G タンパク質の同定を試みた。その結果、いくつかの Gq 型アルファサブユニットをコードする遺伝子が下垂体の特定の細胞ではなく、普遍的に発現していることがわかった。

野生型の 293T 細胞にメダカ Opn5m とエクオリンを発現させて光を照射すると、細胞内カルシウム濃度が変化し、エクオリンの発光強度の変化として捉えることができる。293T 細胞から、Gq 型 G タンパク質アルファサブユニットのパラログ遺伝子(GNAQ, GNA11, GNA14, GNA15)をすべてノックアウトした細胞株を調製した(293T GQ)。この 293T GQ 細胞にメダカ Opn5m とエクオリンを発現させて光を照射すると、野生型で見られた光依存的な発光強度変化は完全に消失した。つまり、メダカ Opn5m は Gq 型 G タンパク質のいずれかを活性化して、細胞内カルシウム濃度変化をもたらすことがわかった。次に、メダカ Opn5m とエクオリンに加え、マウスまたはメダカの Gq 型 G タンパク質アルファサブユニットを共発現させて発光測定を行った。その結果、光依存的な反応は回復し、Opn5m は特に Gna14 と呼ばれるサブタイプを効率的に活性化することがわかった。

(4) LH/FSH 産生細胞由来細胞株 L T2 の細胞内カルシウム濃度の光操作

マウス下垂体 LH/FSH 産生細胞に由来する細胞株 L T2 細胞を入手し、メダカ Opn5m とエクオリンを遺伝子導入したところ、光照射依存的にエクオリンの発光強度変化、つまり細胞内カルシウム濃度変化を捉えることができた。しかし、その強度変化は 293T で見られるものに比べると著しく弱かった。これは遺伝子導入効率が低いことによるものであると考えられ、現在これを向上させるためにトランスフェクション試薬を含め、条件を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujiyabu Chihiro, Sato Keita, Nishio Yukimi, Imamoto Yasushi, Ohuchi Hideyo, Shichida Yoshinori, Yamashita Takahiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Amino acid residue at position 188 determines the UV-sensitive bistable property of vertebrate non-visual opsin Opn5	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03010-x	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 Kanzaki Yuki, Fujita Hirofumi, Sato Keita, Hosokawa Mio, Matsumae Hiroshi, Shiraga Fumio, Morizane Yuki, Ohuchi Hideyo	4. 巻 61
2. 論文標題 KCNJ13 Gene Deletion Impairs Cell Alignment and Phagocytosis in Retinal Pigment Epithelium Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 38 ~ 38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.61.5.38	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 Habuta Munenori, Yasue Akihiro, Suzuki Ken-ichi T., Fujita Hirofumi, Sato Keita, Kono Hitomi, Takayama Ayuko, Bando Tetsuya, Miyaishi Satoru, Oyadomari Seiichi, Tanaka Eiji, Ohuchi Hideyo	4. 巻 15
2. 論文標題 Fgf10-CRISPR mosaic mutants demonstrate the gene dose-related loss of the accessory lobe and decrease in the number of alveolar type 2 epithelial cells in mouse lung	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0240333
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0240333	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 Sato Keita, Nwe Nwe Khine, Ohuchi Hideyo	4. 巻 -
2. 論文標題 The Opsin 3/Teleost multiple tissue opsin system: mRNA localization in the retina and brain of medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.25106	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤恵太、Liu Yang、山下高廣、大内淑代
2. 発表標題 小型魚類メダカを用いた網膜色素変性症原因遺伝子eyes shut homologの機能解析
3. 学会等名 日本解剖学会第 75 回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤恵太、Liu Yang、山下高廣、大内淑代
2. 発表標題 メダカ網膜における細胞外マトリックスタンパク質eyes shut homologの機能解析
3. 学会等名 第92回日本動物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 恵太、Khine Nwe Nwe、大内淑代
2. 発表標題 メダカOpn3/tmt オプシンmRNAの網膜・脳における組織局在
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keita Sato, Liu Yang, Takahiro Yamashita, Hideyo Ohuchi
2. 発表標題 Generation of a medaka model for inherited retinal disease by Crispr/Cas9 mediated genome editing
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	神田 真司 (Kanda Shinji) (50634284)	東京大学・大気海洋研究所・准教授 (12601)	

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