

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15844

研究課題名（和文）松果体と眼の光受容シグナルの統合と並列処理

研究課題名（英文）Integration and parallel processing of light information from pineal and eyes

研究代表者

和田 清二（Wada, Seiji）

大阪市立大学・大学院理学研究科・特任助教

研究者番号：90747320

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類を除く脊椎動物は、眼以外の光受容器として松果体を有する。松果体には眼の網膜の視細胞とよく似た光受容細胞が存在し、眼とは異なる光受容タンパク質が発現する。また、松果体も眼と同様に光情報を脳へ伝えられることが示唆されていた。しかし、松果体の光受容を起点とした光応答が脳の中で観測された例はこれまでない。そこで本研究では松果体が受け取った光情報が脳のどこに伝えられるのかをWhole-brain imagingにより明らかにすることを目指した。その結果、松果体オプシンの分子特性に注目した光刺激法を最適化し、松果体の光受容由来の応答を示した脳領域を可視化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、松果体の光情報が脳へ伝えられることが生理学的に実証された。また、松果体と眼の光情報が統合される現象を捉えた。異なる光受容器由来の光情報が脳内で統合されることから、単に、眼や松果体といった光受容器単位で生理機能を発現するのではなく、光受容器どうしの協調が機能発現をもたらす新しい可能性を見出した。また、異なる「感覚器」由来の情報の統合とも捉えられ、感覚のマルチモダリティを示しているものでもあり、社会的意義のある成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Non-mammalian vertebrates have the pineal organ as a photoreceptive organ as well as eyes. The pineal organ possesses photoreceptor cells similar to visual cells in the retina and expresses photoreceptive proteins, opsins, that differ from those of the retina. It has also been suggested that the pineal organ possibly transmits light information to the brain, like the retina. However, it has not been physiologically shown if a photoresponse originating from photoreception in the pineal organ has been observed in the brain. In this study, we attempted to clarify where the light information received in the pineal organ is transmitted with whole-brain imaging. As a result, we optimized the light stimulation focusing on the molecular property of a pineal opsin and successfully visualized the brain regions that showed responses derived from pineal photoreception.

研究分野：光生物学

キーワード：オプシン ゼブラフィッシュ 松果体

1. 研究開始当初の背景

動物の多くは、光受容器として眼を有する。ヒトの眼の網膜には光を感じるための細胞、視細胞が存在し、そこには光感受性タンパク質、オプシンが存在する。ヒトの視細胞にはロドプシンと3種類の錐体オプシンが別々に発現しており視覚を支えている。ロドプシンは暗所視、錐体オプシンは明所視に寄与する。一方、哺乳類を除いた脊椎動物の多くは、第3の眼と呼ばれる光受容器、松果体を有している。魚類などの松果体には網膜の視細胞と形態的によく似た光受容細胞が存在し、そこには、眼とは異なるレポトリのオプシンが存在する。また、網膜視細胞内のシグナル伝達に関わる分子も松果体に発現していることが知られており、視細胞とほとんど同様の分子機構によって松果体光受容細胞も光を受容していると考えられる。さらに、網膜と同様に、松果体は神経節細胞を介して脳に神経性の光情報を伝達していると考えられており、さまざまな先行研究において、松果体の光依存的な神経応答が見いだされている。すなわち、眼に次ぐ主要な光受容器として、動物の光感覚を支えていることが示唆される。しかしながら、視覚とは異なる松果体の光受容がどのような生理機能と関わっているのかは、依然としてわかっていない。

先行研究における組織学的なアプローチにより、松果体が情報を伝達する可能性のある脳領域として複数の領域が示唆されていた。しかし、松果体の光受容を起点とした光応答が生理学的に脳の中で観測された例はない。そこで、研究代表者は、自身の関わる先行研究において同定した魚類ゼブラフィッシュの松果体オプシンの分子特性に立脚した研究を展開した。具体的には、松果体オプシンの1つであるパラピノプシン1 (PP1) のもつ分子特性に注目した。PP1は紫外光 (UV) を吸収する UV 受容体である。UV を吸収すると光産物 (活性化状態) に変化するが、この光産物は可視光を受容し元の UV 受容体に戻る。この PP1 の分子特性を利用し、PP1 の光受容に基づく松果体神経節細胞や脳の変化した成分を抽出することを目指した。

2. 研究の目的

松果体の光情報が、脳のどの領域に伝えられるのかを明らかにし、さらに、その領域で、眼や松果体などの光受容器が受け取った光情報が統合あるいは並列的に処理されるのかを理解することを目指した。

3. 研究の方法

全脳に蛍光カルシウムプローブである GCaMP を発現する系統 *Tg(HuC:GCaMP6s)* を用いて、二光子顕微鏡によるカルシウムイメージングを行った。脳内のカルシウム変化を捉えながら、PP1 の分子特性に基づき設計された光刺激を行い、松果体由来の光情報が脳のどの領域に伝えられるのかを精査した。また、異なる光受容器由来の光情報の統合・並列処理を観測するために、野生型に加え、眼球切除個体、および松果体オプシン変異体を使用した。

4. 研究成果

Tg(HuC:GCaMP6s) 系統を用いた二光子顕微鏡による Whole-brain imaging を行い、松果体に可視光レーザーによる刺激を行った結果、全脳の大部分が光反応を示した。特に、視蓋、手綱核など、眼からの光情報を受け取る脳領域において顕著にみられ、松果体をターゲットしたレーザーによる光刺激は、光の拡散により眼に光が受け取られている可能性が考えられた。そのため、松果体特異的な光反応を生み出す、光刺激を検討した。松果体オプシンの1つであるパラピノプシン1 (PP1) は UV 感受性で、UV を吸収し、G タンパク質を活性化する状態 (光産物) に光変換するとともに、可視光感受性となる。光産物は可視光を吸収し、元の UV を吸収する状態 (非活性化状態、暗状態) に戻る。この性質を利用した光刺激の最適化を行った。研究代表者はまず、PP1 が発現する松果体光受容細胞に GCaMP を発現する系統 *Tg(pp1:GCaMP6s)* を用いて、松果体に対する UV 刺激を行った。UV 刺激により、PP1 は G タンパク質トランスデュースを活性化し、その結果、細胞のカルシウムレベルを低下させる。ここで UV を照射したまま追加で可視光を照射した。その結果、可視光追加によりカルシウムレベルが増加することがわかった (「UV で “さがり” 可視光で “あがる” 反応」)。このことは、PP1 が UV を吸収し光産物となり、G タンパク質を活性化していた状態の光産物が、可視光を吸収することにより暗状態に戻る、すなわち活性化状態 (光産物) の量が、可視光の追加によって減少したことを意味している。すなわち、PP1 の分子特性が寄与している光反応である。研究代表者は、この PP1 の分子特性に基づく反応が、松果体神経節細胞においても観察されるのかを確かめた。松果体神経節細胞に GCaMP を発現する *Tg(HuC:GCaMP6s)* 系統を用いて、同様の光刺激を与え、解析した。その結果、いくつかの神経節細胞が UV で “さがり” 可視光で “あがる” 反

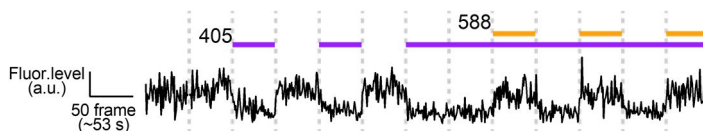


図 1. 松果体神経節細胞が示す、UV で “さがり” 可視光で “あがる” 反応

応を示すことを見出した(図 1)。これらの反応の主要な成分が PP1 の光受容に基づいている反応であることを、PP1 欠損変異体を用いて定量的に解析した(図 2)。UV で“さがった”ピクセル数および、可視光で“あがった”ピクセル数を松果体エリアのピクセル数で割った値をプロットしたヒストグラムにより比較したところ、WT (PP1^{+/+}), PP1^{+/-}は、非常によく似たプロファイルを示した。一方で、PP1^{-/-}は、大きな変化を示したピクセルが少ない。しきい値を超える変化率を示したピクセルの和を定量的に解析した結果、UV に対する“さがり”においても、可視光に対する“あがり”においても、WT と PP1^{-/-}の差について統計的に有意であると認められる(図 3)。したがって、松果体神経節細胞における UV で“さがり”可視光で“あがる”反応のどちらにも PP1 の光受容が寄与していることが示された。

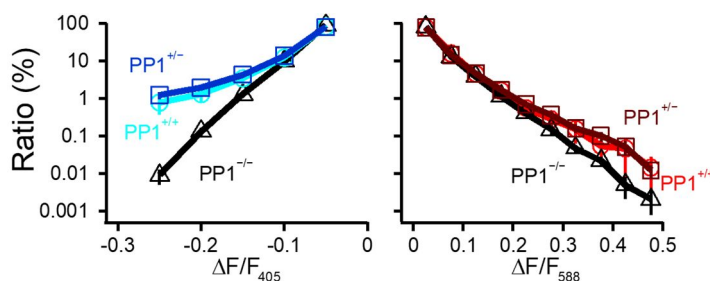


図 2. 各遺伝子型 (PP1^{+/+}, PP1^{+/-}, PP1^{-/-}) の松果体神経節細胞の反応画像において、UV で“さがった”ピクセル (左) および可視光で“あがった”ピクセル数 (右) (松果体面積中の比率) を示すヒストグラム

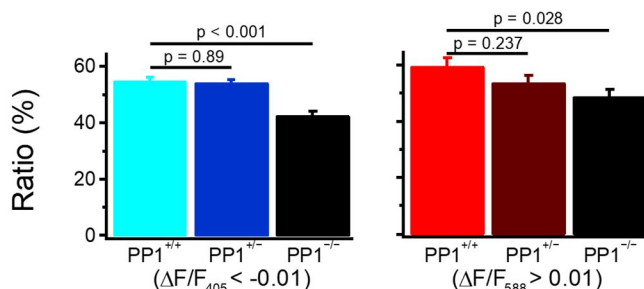


図 3. 各遺伝子型 (PP1^{+/+}, PP1^{+/-}, PP1^{-/-}) の松果体神経節細胞の反応画像において、1%を超える変化を示したピクセルの和 (左: UV で“さがった”ピクセル, 右: 可視光で“あがった”ピクセル) を示す棒グラフ

松果体には、PP1 以外にもエクソロドプシンや、LWS オプシン、パラピノシン 2 などの可視光感受性オプシンが PP1 とは異なる光受容細胞が存在する。すなわち、これらのオプシンの光受容に基づく光反応が松果体神経節細胞にあらわれうる。そこで、さまざまな光反応の中から、PP1 の光受容に基づく光反応を主要に抽出するための画像解析を行った。具体的には、UV によりカルシウムレベルの低下を示し、かつ、可視光でカルシウムレベルの上昇を示した、神経節細胞を可視化した(図 4)。研究代表者は、この方法により、松果体の光情報が伝えられる脳領域を同定できる可能性を見出し、Whole-brain imaging に取り組んだ。

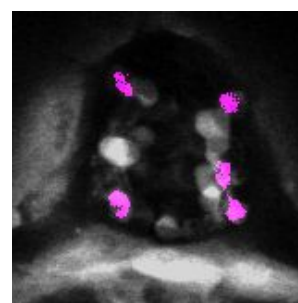


図 4. UV で“さがり”可視光で“あがる”反応を示した松果体神経節細胞を可視化 (マゼンタ)

この光刺激を Whole-brain imaging に適用し、UV で“さがり”、可視光で“あがる”という条件を満たした脳領域を抽出し、可視化した結果、中脳の一部の領域の限定的なニューロンが、PP1 由来の光情報を受け取っていることが示唆された。また、それ以外の領域において、UV で“さがり”、可視光で“あがる”反応はほぼ観察されなかった。このことから、PP1 が起点となる光応答の大部分が中脳に伝えられると考えられる。PP1 由来の光応答であるのかを確かめるために、PP1 欠損変異体を使用し、同様の実験を行ったところ、当該領域における UV で“さがり”可視光で“あがる”反応はほぼ消失した。

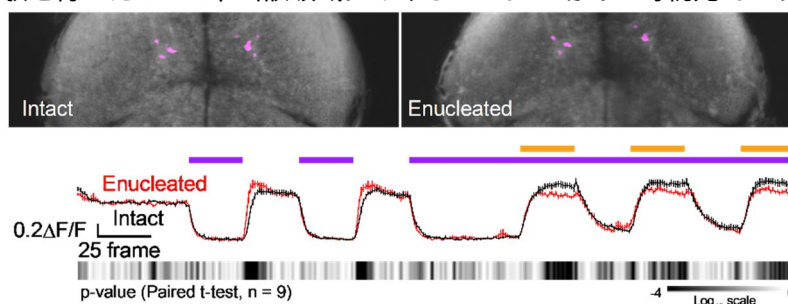


図 5. UV で“さがり”可視光で“あがる”反応を示す中脳の一部のニューロン (マゼンタ) の眼球切除前後の比較解析。処置前 (Intact) も切除後 (Enucleated) も、UV でさがり可視光であがる領域に差は見られない (上)。カルシウム変化プロファイルと比較すると、切除後 (赤) は処置前 (黒) に比べ UV (紫色のバー) 照射を OFF にした直後のカルシウムのあがり素早く、また、可視光 (黄色のバー) 照射中のカルシウムレベルが低い。

さらに研究代表者は、この中脳における UV で“さがり”可視光で“あがる”光反応に PP1 以外の光受容が関与しているのかを確かめるために、眼球切除前後のカルシウム変化プロファイルを比較したところ、UV が OFF になった直後や、可視光が ON の間に差が認められた(図 5)。このことは、松果体と眼が受け取る光情報は、中脳で統合されていることを意味している。すなわち、異なる光受容器に由来する光情報が脳内で統合されるという新しい知見を得た。以上のような、異なる光受容器からの情報統合により、どのような光感覚がもたらされ、その光感覚によりどのような生理・行動が発現するのは非常に興味深い。今後、神経生理・行動学的な解析により解明されることが望まれる。

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 3件）

1. 著者名 Shen Baoguo, Wada Seiji, Nishioka Haruka, Nagata Takashi, Kawano-Yamashita Emi, Koyanagi Mitsumasa, Terakita Akihisa	4. 巻 7
2. 論文標題 Functional identification of an opsin kinase underlying inactivation of the pineal bistable opsin parapinopsin in zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-021-00171-1	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 -

1. 著者名 Kawano-Yamashita Emi, Koyanagi Mitsumasa, Wada Seiji, Saito Tomoka, Sugihara Tomohiro, Tamotsu Satoshi, Terakita Akihisa	4. 巻 10
2. 論文標題 The non-visual opsins expressed in deep brain neurons projecting to the retina in lampreys	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9669
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66679-2	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 Wada Seiji, Kawano-Yamashita Emi, Sugihara Tomohiro, Tamotsu Satoshi, Koyanagi Mitsumasa, Terakita Akihisa	4. 巻 19
2. 論文標題 Insights into the evolutionary origin of the pineal color discrimination mechanism from the river lamprey	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12915-021-01121-1	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10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田清二、小柳光正、寺北明久
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおける松果体光情報の処理に関わる脳部位候補の解析
3. 学会等名 日本動物学会 第91回大会（オンライン）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田清二、沈宝國、山下(川野)絵美、永田崇、日比正彦、保智己、小柳光正、寺北明久
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおける松果体光応答：「色検出」とその脳投射
3. 学会等名 S1「ゼブラフィッシュが切り開く新たな生物学」、日本動物学会 第91回大会 (オンライン)(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真野桃歌、和田清二、小柳光正、寺北明久
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ網膜におけるメラノプシンの視覚への関与に関する解析
3. 学会等名 日本動物学会 第91回大会 (オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真野桃歌、和田清二、小柳光正、寺北明久
2. 発表標題 Functional analysis of melatonin expressed in retinal horizontal cells of zebrafish
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第42回山形大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Seiji Wada, Mitsumasa Koyanagi, Akihisa Terakita
2. 発表標題 Transmission of light information generated in the pineal organ to the midbrain in zebrafish
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第43回札幌オンライン大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田清二, 小柳光正, 寺北明久
2. 発表標題 オブシン欠損変異体を用いたゼブラフィッシュ松果体光応答の解析
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Momoka Mano, Seiji Wada, Mitsumasa Koyanagi, Akihisa Terakita
2. 発表標題 A possible regulation of cone light responses by melanopsin distributed to horizontal cells in the larval zebrafish
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第43回札幌オンライン大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuya Namikoshi, Seiji Wada, Mitsumasa Koyanagi, Akihisa Terakita
2. 発表標題 Toward detection of neural activity changes in the zebrafish brain derived from extraocular photoreceptions
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第43回札幌オンライン大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真野桃歌, 和田清二, 小柳光正, 寺北明久
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ網膜におけるメラノプシン発現水平細胞の光に対する応答の解析
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本悠貴, 斉藤智花, 和田清二, 小柳光正, 寺北明久
2. 発表標題 松果体オプシン、パラピノプシン1変異ゼブラフィッシュを用いた光依存的な行動の解析
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Koyanagi Mitsumasa, Saito Tomoka, Wada Seiji, Nagata Takashi, Kawano-Yamashita Emi, Terakita Akihisa	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 11
3. 書名 Optogenetic Potentials of Diverse Animal Opsins: Parapinopsin, Peropsin, LWS Bistable Opsin	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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