

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成23年3月31日現在

機関番号：24402
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2010～2011
課題番号：22657022
研究課題名（和文） 機能未知のロドプシン類を手掛かりとしたマウス脳内光受容能の解明
研究課題名（英文） Analysis of photoreceptive ability in mouse brain based on functionally unknown rhodopsin-related proteins
研究代表者 寺北 明久（TERAKITA AKIHISA） 大阪市立大学・大学院理学研究科・教授 研究者番号：30212062

研究成果の概要（和文）：光受容タンパク質の候補分子であるエンセファロプシンのなかまは、脊椎動物や無脊椎動物の脳内にその mRNA が同定されているので、それが実際に光受容タンパク質として機能しているのかが興味深い。試験管内実験により、エンセファロプシングループのタンパク質が光受容タンパク質として機能しうことを明らかにした。また、マウス脳において、エンセファロプシンを発現している細胞を単離するために、マウスエンセファロプシンの上流配列下で緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現したところ、マウス小脳内の細胞に GFP を発現する遺伝子導入マウスが得られた。

研究成果の概要（英文）：It was reported that mRNA of an opsin, encephalopsin has been identified in brain of mammalian and non-mammalian vertebrates and therefore it is of interest to elucidate whether it actually serves as a light-sensor. *In vitro* experiments suggested that a member of encephalopsin group could act as a light-sensing G protein-coupled receptor. We successfully prepared transgenic mice that express green fluorescence protein (GFP) under regulation of upstream of encephalopsin gene and found GFP expression in the brain cells. The mice could facilitate to specifically isolate encephalopsin-expressing cells and characterize its photosensitivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	0	2,200,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：分子生理学

科研費の分科・細目：基礎生物・動物生理行動

キーワード：ロドプシ、光受容、シグナル伝達、視覚、非視覚、多様性、動物生理化学

1. 研究開始当初の背景

多くの動物は、光を受容して、視覚や生体リズムの調節などに用いている。これまでの研究から、哺乳類以外の脊椎動物は眼に加えて松果体や脳深部に光受容能を持つが、ヒトを

含む哺乳類の光のセンサーは眼にのみ存在していると考えられている。～15年前に注目された膝の裏に存在する青色光センサー（Campbell et al, Science 279, 396-, 1998）は現在では多くの研究により否定されている(例

えは Wright Jr et al, Science 297, 571-, 2002)。また、哺乳類の脳の光応答を記載した報告はわずかにあるが (Wade et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9322-, 1988)、分子レベルでの裏付けない。一方、分子レベルでは、視物質ロドプシンと類似した光受容タンパク質 (以後ロドプシン類と略) の遺伝子が、マウスとヒトの脳 (encephalon) から単離され、エンセファロプシンと名付けられた (Blackshaw et al, J. Neurosci. 19, 3681-90, 1998)。その後、魚類、鳥類、両生類などの脊椎動物やゴカイや昆虫などの無脊椎動物の脳にもエンセファロプシン様タンパク質が見出された。

エンセファロプシンは、遺伝子レベルと mRNA のレベルでしか同定されていないが、本当に光受容“タンパク質”として機能していれば、これまでの定説に反して、哺乳動物の脳の中に、光センサー機能が存在している可能性がある。しかし、エンセファロプシンが実際に光受容タンパク質として機能できるのかは、培養細胞系での発現・解析が困難なために示されてこず、今では哺乳類脳でのエンセファロプシンと光受容との関連はほとんど注目されなくなった。しかし、申請者らはエンセファロプシンが光受容タンパク質として機能する可能性を示唆する実験結果を分光学的、生化学的に得た。そこで、エンセファロプシンを出発点とすると、エンセファロプシンを含む哺乳類の脳細胞が光応答する能力があることを検証できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、次の2点を目的とした。

(1) エンセファロプシンやその類似タンパク質は、脊椎動物と無脊椎動物に広く存在し、エンセファロプシンファミリーを形成している。そこで、エンセファロプシンファミリーに属するオプシンが、発色団レチナルを結合して、光受容タンパク質として機能できるのかを明らかにする。また、Gタンパク質を介するシグナル伝達系を駆動できるのかについても、明らかにする。

(2) マウスエンセファロプシン遺伝子の上流配列に GFP (緑色蛍光タンパク質) をつないだ遺伝子を導入したマウスのヘテロを既に7系統確立している。それらの中で、もっとも GFP の mRNA の発現量が多い系統を選び、GFP がエンセファロプシンを発現している細胞に観察される系統を確立し、単離細胞を用いた解析の基礎部分を確立する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いたエンセファロプシン類の発現と解析

培養細胞にエンセファロプシングループに属するオプシンの遺伝子を導入し、強制的にタンパク質を発現させた後、発色団レチナルを加えて色素を再構成し、吸収スペクトル

を、分光光度計を用いて測定した。また、Gタンパク質の活性化能は、放射性同位元素でラベルされた、分解されにくい GTP の類似物を用いて、試験管内で測定した。さらに、培養細胞の中で起こる細胞内情報伝達を司るセカンドメッセンジャーの量的な変化について、そのセカンドメッセンジャーを感知するセンサータンパク質を培養細胞中に同時に発現させることにより、セカンドメッセンジャーの量をリアルタイムで測定し、エンセファロプシン類が Gタンパク質を介する情報伝達系を駆動するのかを解析した。

(2) 遺伝子導入マウスの作製と系統化
マウスエンセファロプシンの上流配列下で緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するように設計した遺伝子をマウスに導入し、GFP 遺伝子導入 (Tg) マウスを作製した。8種類のヘテロマウスを得たので、リアルタイム PCR で脳細胞に発現する GFP の mRNA 量を定量して、GFP の発現量が最も多い系統を選び、ホモ系統を確立した。

4. 研究成果

(1) エンセファロプシンの分子レベルでの解析

エンセファロプシンの分光学的解析:エンセファロプシンファミリーに属するオプシンは、3種類に分類できる。2種類については、遺伝子コンストラクトを工夫することにより、哺乳類の培養細胞を用いて比較的多量に発現し、精製することに成功した。分光学的解析により、吸収極大を決定するとともに、このエンセファロプシン類には、これまで知られていなかった発色団レチナルの結合特異性を見出した。

残りの1種類については同様の発現系では機能的なタンパク質を得ることは困難であることが分かった。ゼブラフィッシュ視細胞において、視物質ロドプシンのプロモーター下でエンセファロプシンを強制発現させる遺伝子コンストラクトをゼブラフィッシュに遺伝子導入し、眼の網膜の桿体細胞にそのエンセファロプシンを強制的に発現させることを試みた。免疫組織化学的に発現を調べたところ、そのエンセファロプシンは、幼魚では比較的全ての桿体視細胞に発現していることが明らかになった。一方、成長にともない視細胞の外節が小さくなっていく現象が起こることも分かった。この遺伝子導入ゼブラフィッシュの稚魚を多量に得ることにより、残りの1種類のエンセファロプシンの解析が可能となることが期待された。

培養細胞系を用いて精製試料を得ることができた2種類のエンセファロプシンが光依存的にGタンパク質を介するシグナル伝達系を駆動できるのかを試験管内実験と細胞を用いた実験により解析した。試験管内実験の結果、これら2種類のエンセファロプシン

類は、光依存的に G タンパク質を高効率に活性化することがわかった。さらに、エンセファロプシン類の 1 つを培養細胞に発現させて、その細胞において光依存的に細胞内のセカンドメッセンジャーの濃度の変化を測定する系を確立した。すなわち、培養細胞ではあるがエンセファロプシン類発現している細胞の光応答を検出できた。

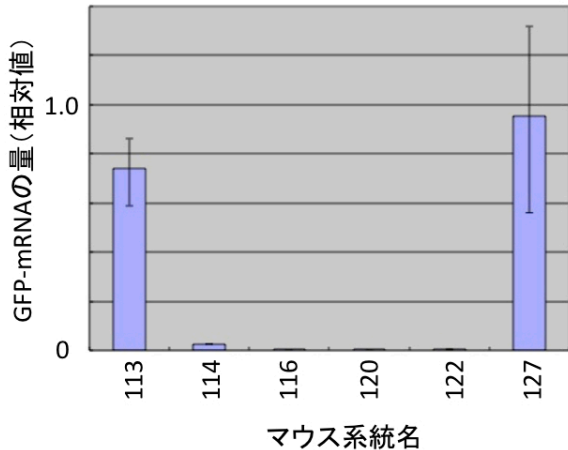


図 1 : マウス脳における GFP の mRNA のリアルタイム PCR による定量

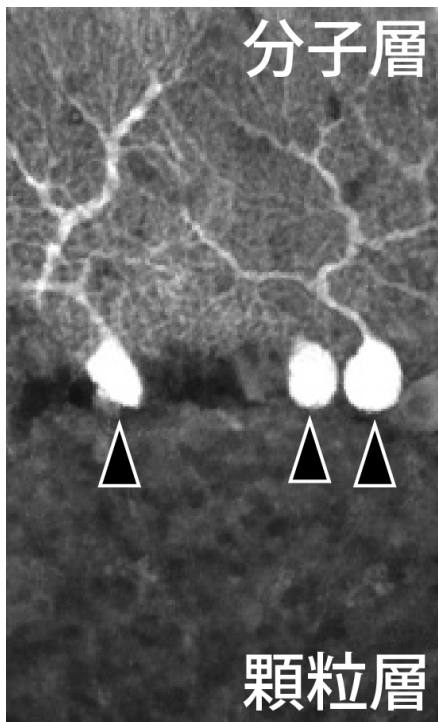


図 2 : GFP 遺伝子導入マウスの小脳における GFP 発現細胞の蛍光像

(2) GFP によるエンセファロプシン発現細胞の標識

エンセファロプシン遺伝子の上流配列に GFP 遺伝子を連結させた遺伝子を導入した Tg ヘテロマウスを 7 系統作製していた。交配によりそれぞれの系統のホモマウスを得て、それらマウスの脳内における GFP の mRNA の発現量をリアルタイム PCR で定量した。その結果、図 1 に示すように、127 系統がもっとも多くの GFP mRNA を発現していることが分かった。

127 系統のホモマウスの小脳スライスを作製し、観察したところ、プルキンエ細胞に GFP の明確な発現が認められた(図 2)。この結果は、既に報告されているエンセファロプシン mRNA が小脳のプルキンエ細胞に存在していることを示す *in situ* hybridization 解析の結果と一致しており、GFP 蛍光を標識としてエンセファロプシン細胞の解析が可能であると考えられる。具体的には、GFP 発現細胞を電気生理学的に解析できる可能性が考えられ、また、セルソーター等により集めることにより、エンセファロプシン発現細胞の生化学的な解析が可能であると期待された。

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 7 件)

- ① K. Sakai, Y. Imamoto, C.-Y. Su, H. Tsukamoto, T. Yamashita, A. Terakita, K.-W. Yau and Y. Shichida: Photochemical Nature of Parietopsin: *Biochemistry* 51, 1933-1941 (2012)
- ② T. Nagata, M. Koyanagi, H. Tsukamoto, S. Saeki, K. Isono, Y. Shichida, F. Tokunaga, M. Kinoshita, K. Arikawa and A. Terakita: Depth perception from image defocus in a jumping spider. *Science* 335, 469-471 (2012)
- ③ A. Terakita, E. Kawano-Yamashita and M. Koyanagi: Evolution and diversity of opsins. *WIREs Membr Transp Signal* 1, 104-111 (2012)
- ④ E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi, Y. Shichida, T. Oishi, S. Tamotsu and A. Terakita: Beta-arrestin functionally regulates the non-bleaching pigment parapinopsin in lamprey pineal. *PLoS One* 6, e16402 (2011)
- ⑤ M. Wakakuwa, A. Terakita, M. Koyanagi, DG Stavenga, Y. Shichida and K. Arikawa: Evolution and mechanism of spectral tuning of blue-absorbing visual pigments in butterflies. *PLoS One* 5, e15015 (2010)
- ⑥ H. Tsukamoto and A. Terakita: Diversity and functional properties of bistable

pigments. Photochem Photobiol Sci. 9,
1435-1443 (2010)

- ⑦ 小柳光正、寺北明久：視覚の分子基盤の進化・多様性：動物の多様なロドプシンとシグナル伝達系の比較から何がわかるか 細胞工学 30, 288-294 (2011)

〔学会発表〕(計 28 件)

- ① 寺北明久：視物質の吸収特性が生み出す意外な視覚機能：ハエトリグモのピンぼけ像による奥行き知覚。日本動物学会第 82 回大会，大雪クリスタルホール(旭川市) 2011 年 9 月 21 日
- ② A. Terakita: Diversity of opsin-based photopigments in non-visual function. The 5th Asia and Oceania Conference on Photobiology, Nara New Public Hall (奈良市) 2011 年 7 月 31 日
- ③ M. Koyanagi: Diversity of non-visual photopigment parainopsin and evolution of pineal color discrimination. Annual Conference of Society for Molecular Biology and Evolution, 京都大学 (京都市) 2011 年 7 月 28 日
- ④ A. Terakita: Investigation on wavelength sensitivities and distributions of visual pigments in the four-layered retina in jumping spiders. FASEB Summer Research Conference, Carefree Resort (アメリカ合衆国・アリゾナ) 2011 年 6 月 22 日
- ⑤ M. Koyanagi: Diversity and evolution of opsin-based pigments in non-visual function. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Nagoya congress Center (名古屋市) 2011 年 6 月 4 日
- ⑥ T. Nagata : Investigation on wavelength sensitivities and distributions of visual pigments in the four-layered retina in jumping spiders. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Nagoya congress Center (名古屋市) 2011 年 6 月 4 日
- ⑦ 本多隼人：ハマダラカ網膜におけるエンセファロプシン発現細胞の特徴。日本動物学会第 81 回大会 東京大学教養学部 (東京) 2010 年 9 月 23 日
- ⑧ A. Terakita: Functional characterization of non-visual bistable pigments, The 14th International Conference on Retinal Protein, UCSC Porter College (アメリカ合衆国・サンタクルズ), 2010 年 8 月 6 日

〔図書〕(計 1 件)

- ① A. Terakita: Diversity and evolution of animal rhodopsin and phototransduction cascade. In “Photobiology: Principles, Applications and Effects” (ed. Leon N. Collignon and Claud B. Normand), pp179-193, Nova Science Publishers, Inc., New York (2010)

〔その他〕

ホームページ等

(新聞報道) 読売新聞、朝日新聞、毎日新聞、産経新聞、日経新聞他 2012 年 1 月 27 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺北 明久 (TERAKITA AKIHISA)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 30212062

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし