

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657175

研究課題名（和文）概日リズムの光センサー・メラノプシンが関与する表現型多型の予測

研究課題名（英文）Functional analysis of genetic variation in melanopsin, a non-visual photoreceptor protein for circadian photoentrainment and its implication for phenotype.

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・准教授

研究者番号：30379276

研究成果の概要（和文）：哺乳類において概日リズムの光受容タンパク質として機能するメラノプシンについて、これまで困難とされていた培養細胞を用いた大量発現および分光学的・生化学的解析に成功した。さらに、ヒトに存在する多型変異を導入した変異型メラノプシンを作製し、その機能解析にも成功した。また、メラノプシンと同様、視覚以外の光受容に関与することが示唆されており、特に、哺乳類の脳など一般には光受容器官とは考えられていない組織で発現していることから非常に注目されているエンセファロプシン (Opn3) について、そのホモログの機能解析に成功し、Gi および Go 型 G タンパク質共役型光受容タンパク質として機能することを示した。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in a large scale expression of a mammalian melanopsin, a circadian photoreceptor protein, and its polymorphic variant in cultured cells, and elucidated photochemical and biochemical characteristics of them. We also successfully analyzed homologues of another non-visual photopigment Opn3, which are expressed in various tissues considered to be nonphotoreceptive such as brain and liver. We found that Opn3 homologues act as photosensitive pigments and activate Gi- and Go-type G proteins in a light-dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：人類学・応用人類学

キーワード：光生物 蛋白質 生理学 医療・福祉 遺伝学

### 1. 研究開始当初の背景

私たち人類を含む多くの動物は、概日リズムと呼ばれるおよそ 24 時間周期の自発的な活動のリズムを持っている。概日リズムは 24 時間周期から若干ずれており、通常は太陽光を浴びることによって時計がリセットされて周期的なリズムが保たれる。概日リズムは睡眠や学習の効率といった生活の質と密接に関わることから、近年、その調節の重要性が指摘されている。この概日リズムの光調節は、視覚を支える光受容タンパク質（視物質）

に類似した光受容タンパク質であるメラノプシンが担っていることがわかっている。興味深いことに、ヒトのメラノプシン遺伝子には多型があり、概日リズムの調節に関わる表現型多型が存在する可能性が想像される。実際、メラノプシンのある多型が季節性情動障害と関連していることを示唆する報告もある。したがって、もしメラノプシンの多型についてタンパク質レベルでの機能解析が出来れば、光受容に関与する情動障害、リズム障害あるいは睡眠障害などの新たな表現型

の発見につながると期待される。しかしながら、これまでヒトやマウスのメラノプシンを十分量調整することには誰も成功しておらず、その点がこの戦略の障害となっていた。

これまでに申請者は、困難とされていた様々な動物の光受容タンパク質の培養細胞発現系の構築およびタンパク質機能解析に成功してきた (Koyanagi et al., FEBS Lett. 531, 525-528 2002; PNAS 101, 6687-6691 2004; PNAS 105, 15576-15580 2008; Terakita et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 11, 284-289 2004; J Neurochem. 105, 883-890 2008)。特にメラノプシンに関しては、頭索動物のホモログに注目することによって、初めてのタンパク質機能解析に成功し、現在知られているメラノプシンの一般的な性質の大部分を明らかにした (Koyanagi et al., Curr. Biol. 15, 1065-1069 2005)。

また、ヒトを含む多くの動物は、メラノプシン以外にも、視覚以外の光受容に関与する光受容タンパク質を複数もつことが知られている。その中でも、エンセファロプシン (Opn3) およびそのホモログは、哺乳類の脳や他の脊椎動物の肝臓や心臓といった、従来は光受容器官とは考えられていない組織で発現が認められることから、未知の光受容を担っていると想像されており、近年非常に注目されている。これら“非視覚系”光受容タンパク質の解析によって、視覚以外の未知の光受容の発見、さらには光受容に関わる新規の表現型多型の発見が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、次の2点を目的とした。

(1) 哺乳類の概日リズムの光受容タンパク質であるメラノプシンについて、培養細胞を用いた大量発現系および機能解析系を構築する。さらに、発現に成功した哺乳類メラノプシンを用いて、ヒトに存在する多型変異を導入した変異メラノプシンを作製し、同様に培養細胞での大量発現および機能解析を試みる。

(2) Opn3 のタンパク質レベルの機能解析はこれまで一切行われておらず、特に、一般的な光受容器官以外で発現していることから、本当に光受容タンパク質として機能するのも不明である。そこで、Opn3 およびそのホモログについても、培養細胞発現系を用いて機能解析を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) 哺乳類メラノプシンの培養細胞を用いた大量発現系の構築

①ヒトやマウスのメラノプシンは、生体内に微量にしか存在しないこと、培養細胞を用いたタンパク質発現が困難であることから、十分量の活性のあるメラノプシンを調整する

ことにこれまで誰も成功していなかった。そこで本研究では、これまで多様な光受容タンパク質の発現で培ったノウハウを駆使して哺乳類メラノプシンの大量発現系の構築を試みる。具体的には、さまざまな発現ベクターや培養細胞を試すとともに、私たちのこれまでの研究からメラノプシンのC末端を短くすることによって、光受容タンパク質としての性質を変えることなく、タンパク質の発現量を飛躍的に上げることができることがわかっている (Terakita et al., J. Neurochem. 105, 883-890 2008) ので、C末端の長さをさまざまに変更したメラノプシンを作製し、大量発現を行う。

②哺乳類メラノプシンを用いたメラノプシンの多型解析

ヒトメラノプシンには、アミノ酸の変化をとともなう多型が約10種類存在し、また、ヒトメラノプシンに特異的なスプライスバリエントも見出されている。そこで、上述の大量発現系を用いて、ヒトメラノプシンの多型変異を導入した変異メラノプシンを作製し、機能解析を行う。具体的には、光受容タンパク質の特徴である、吸収する光の波長、活性化するGタンパク質の選択性や効率および細胞内局在を調べ、野生型と比較する。

(2) Opn3 ホモログの機能解析

メラノプシンとは別の非視覚系光受容タンパク質である Opn3 については、これまでいかなる生物のホモログの機能解析も行われていない。そこで、Opn3 については、哺乳類に限定せず、他の脊椎動物や無脊椎動物の Opn3 ホモログを含めて培養細胞を用いた大量発現を試み、Opn3 の性質の解明を行う。

## 4. 研究成果

(1) 哺乳類メラノプシンの培養細胞発現系の確立

複数の哺乳類からメラノプシンをクローニングし、上述の実験条件を検討した結果、哺乳類メラノプシンの大量発現に成功した。発色団である11シス型レチナールを加えることによって光受容タンパク質を生成し、分光学的解析を行った結果、哺乳類メラノプシンは~485nmに吸収極大をもつ青色感受性光受容タンパク質であることが明らかとなった (図1)。さらに、上記の哺乳類メラノプシンに対して、ヒトメラノプシンの多型変異を導入した変異メラノプシンについても、同様の発現系を用いて大量発現に成功した。

(2) Opn3 ホモログの機能解析

ヒトを含め、多様な動物から Opn3 ホモログを単離し、培養細胞での発現を試みた結果、トラフグの TMT オプシンとハマダラカの Opn3 の大量発現に成功した。11シス型レチナールを添加し光受容タンパク質を生成し解析した結果、トラフグ TMT は~460nmに吸

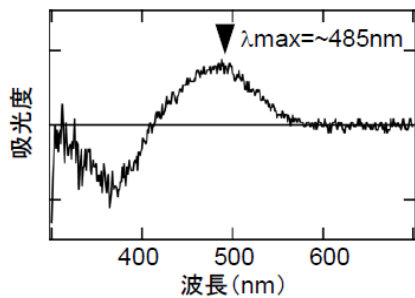


図1 発現に成功した哺乳類のメラノプシン。吸収極大波長は~485nmと推定される。

収極大をもつ青色光感受性光受容タンパク質、ハマダラカ Opn3 は~500nm に吸収極大をもつ緑色光感受性光受容タンパク質であることが明らかとなった (図2)。

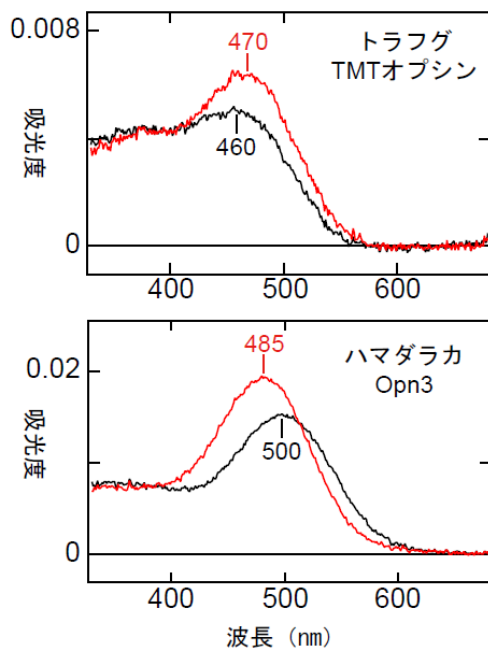


図2 トラフグTMTオプシンおよびハマダラカOpn3の吸収スペクトル

また、生化学的・細胞生物学的解析の結果、これら Opn3 ホモログは、Gi および Go 型 G タンパク質を光依存的に活性化することが明らかとなった。これらの結果は、Opn3 が Gi/Go 共役型光受容タンパク質であり、生体内で光センサータンパク質として機能していることを示している。

さらに私たちは、ハマダラカ Opn3 が、光受容タンパク質の一般的な発色団である 11 シス型レチナールのみならず、9 シス型や 13 シス型のレチナールを発色団として結合し、Gi/Go 共役型光受容タンパク質として機能することを見出した (図3)。興味深いことに、11 シス型レチナールが網膜などの光受容器官のみに特異的に存在するのに対して、13 シ

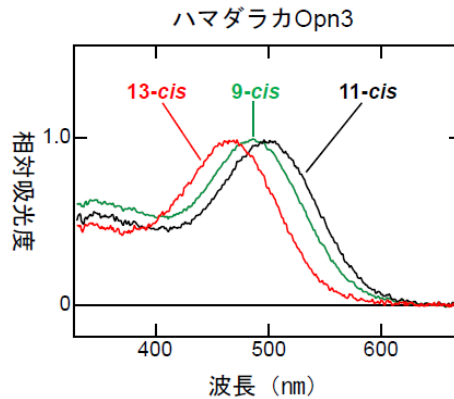


図3 多様なレチナール異性体を発色団とするハマダラカOpn3の吸収スペクトル

ス型レチナールは生体内に普遍的に存在することが知られている。Opn3 はさまざまな動物において、脳や肝臓といった、一般的には光受容器官とは考えられていない組織に発現している。したがって、本研究の「Opn3 が 13 シス型レチナールを発色団として光受容タンパク質として機能できる」という発見は、Opn3 が眼のみならず、ヒトを含むさまざまな動物の脳や肝臓などの器官において、未知の光受容を担っていることを示唆するものである (Koyanagi et al., PNAS 110: 4998-5003 2013)。

#### 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6件)

- ① M. Koyanagi, E. Takada, T. Nagata, H. Tsukamoto, A. Terakita: Homologs of vertebrate Opn3 potentially serve as a light sensor in nonphotoreceptive tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110: 4998-5003 (2013) 査読あり  
DOI: 10.1073/pnas.1219416110
- ② 小柳光正, 寺北明久: ハエトリグモはピンぼけ像を使って奥行きを知覚する 生物の科学 遺伝(エヌ・ティー・エス) 2013年1月号 67(1) p101-106 査読なし
- ③ S. Wada, E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi, A. Terakita: Expression of UV-sensitive parainopsin in the iguana parietal eyes and its implication in UV-sensitivity in vertebrate pineal-related organs. *PLoS One* 7 (6):e39003 (2012) 査読あり  
DOI: 10.1371/journal.pone.0039003
- ④ 永田崇, 小柳光正, 寺北明久: ピンぼけ像を利用したハエトリグモの奥行きを知

覚 ライフサイエンス 新着論文レビュー  
2012年2月29日 査読なし  
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/4426#more-4426>

- ⑤ A. Terakita, E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi: Evolution and diversity of opsins. *WIREs Membr Transp Signal*. 1:104–111 (2012) 査読あり  
DOI: 10.1002/wmts.6
- ⑥ T. Nagata, M. Koyanagi, H. Tsukamoto, S. Saeki, K. Isono, Y. Shichida, F. Tokunaga, M. Kinoshita, K. Arikawa, A. Terakita: Depth perception from image defocus in a jumping spider. *Science* 335: 469-471 (2012) 査読あり  
DOI: 10.1126/science.1211667
- [学会発表] (計 28 件)
- ① 小柳光正: 有袋類の非視覚系光受容タンパク質の解析 日本動物学会第 83 回大会 2012年09月13日 大阪大学・豊中キャンパス (大阪府)
- ② 小柳光正: 光受容タンパク質の分子進化と生理機能との連関 日本進化学会第14回大会 2012年08月22日 首都大学東京・南大沢キャンパス (東京都)
- ③ 小柳光正: 下等脊椎動物における松果体関連器官の波長識別システムの多様性 日本進化学会第14回大会 2012年08月22日 首都大学東京・南大沢キャンパス (東京都)
- ④ 小柳光正: 光受容タンパク質に着目した動物の光受容系の進化と多様性の研究—ハエトリグモのピンぼけ像に基づく新規奥行き知覚メカニズム— 第17回日本光生物学協会年会 2012年08月18日 大阪大学産業科学研究所講堂 (大阪府)
- ⑤ 小柳光正: 松果体の波長識別に関与するパラピノプシンの波長制御機構の解析 日本動物学会第82回大会 2011年9月22日 神楽地区公共施設群 (北海道)
- ⑥ M. Koyanagi: Diversity of non-visual photopigment parapinopsin and evolution of pineal color discrimination Annual Conference of Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE2011) 2011年7月28日 京都大学 (京都府)

⑦ M. Koyanagi: Diversity and Evolution of Non-visual Photopigment Parapinopsin FASEB Summer Research Conferences The Biology and Chemistry of Vision 2011年6月22日 ケアフリーリゾート (アメリカ合衆国、アリゾナ)

⑧ M. Koyanagi: Diversity and evolution of opsin-based pigments in non-visual function 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB2011) 2011年6月4日 名古屋国際会議場 (愛知県)

[その他]

新聞報道等

共同通信、朝日新聞、読売新聞、日本経済新聞、産経新聞 (2012年1月27日)、The New York Times (2012年1月30日) 他

ホームページ等

大阪市立大学大学院理学研究科生体高分子機能学 II 研究室

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/mphys/>

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・准教授  
研究者番号: 30379276

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし