

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500382

研究課題名(和文) 脳の”眼”を構成するオプシン5視細胞の機能解明とその発生分化メカニズム

研究課題名(英文) Studies on an ultraviolet-absorbing photopigment, Opsin 5 in vertebrate eye and brain

研究代表者

大内 淑代 (Ohuchi, Hideyo)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00253229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：紫外光感受性視物質であるオプシン5(Opn5)発現細胞の生体内での機能と発生分化について、鳥類と哺乳類を用いて研究を行っている。本研究では、人工核酸切断酵素によるゲノム編集法を用いて、動物個体においてOpn5遺伝子を改変して、脳と眼におけるOpn5の機能と発生分化のしくみを明らかにすることを目的とした。人工核酸切断酵素として、Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN)を用いて、マウスOpn5変異マウスの作出を行った。その結果、TALEN法により遺伝子変異が効率よくおこること、Opn5変異マウスは正常に産出されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：This research project was aimed for clarifying the functions for an ultraviolet-absorbing photopigment, Opsin 5 in vertebrates such as mouse and chicken by use of a genome-editing technique, TALEN (Transcription activator-like effector nuclease). We succeeded in production of Opn5-knockout mice by this method, finding that Opn5-deficient mice were born alive and seemed healthy at least after 3 weeks postnatal.

研究分野：細胞組織学、発生生物学、神経科学

キーワード：オプシン5 Opsin 5 Opn5 光 紫外光 眼 脳 視床下部

1. 研究開始当初の背景

我々の眼の網膜には、「桿体オプシン」「錐体オプシン」と呼ばれる光感受性タンパク質(ロドプシン類)をもつ視細胞があり、物の形や、明暗、色を区別する視覚を担っている。オプシン5は、英国のFosterらにより最初に報告された、哺乳類の網膜や脊髄に存在する機能が未知の新しいロドプシン類である(Tarttelin EE et al. 2003)。その後、オプシン5がウズラの視床下部に存在し、精巣肥大など非哺乳類の光周性に関与するロドプシン類である可能性が報告された(Nakane Y et al. 2010)。一方、哺乳類のオプシン5細胞の機能については未だ解明されていない(Kojima D et al. 2011)。研究代表者らは、発生途上のニワトリ網膜において、オプシン5 mRNA が存在していることを初めて示した(Tomonari S et al. 2008)。さらに、ニワトリのオプシン5が、紫外光を吸収し、Gタンパク質を活性化させる新しい視物質であること、網膜神経節細胞やアムクリン細胞の一部、視床下部室傍器官セロトニンニューロンに存在することを発見した(Yamashita T/Ohuchi H et al. 2010)。そこで、本研究では、脳や眼に存在するオプシン5細胞の生理機能と発生分化のメカニズムの解明を試みることにした。

2. 研究の目的

(1)オプシン5遺伝子のノックアウト動物をTALEN法により作製し、表現型解析を行う、
(2)オプシン5遺伝子座にレポーター遺伝子をTALEノックイン法により導入し、転写および細胞系譜を解明する、
この2つを具体的な研究目的とした。
TALEN法とは、2011年、植物病原体である*Xanthomonas*から単離された、人工核酸切断酵素TALE Nucleasesを用いるゲノム編集技術であり、一塩基を認識できるドメインで構成されたTranscription Activator-Like Effector (TALE)を利用するものである。

3. 研究の方法

(1)オプシン5遺伝子をノックアウトしたマウスおよびニワトリをTALEN法により作製し、光に依存した行動などに着目して、機能解析を行う。
(2)オプシン5遺伝子内に緑色蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子を挿入(ノックイン)し、オプシン5細胞の細胞系譜や遺伝子発現について調べ、オプシン5細胞の発現誘導および抑制の分子機構を解明する。

4. 研究成果

(1)マウス個体レベルで有効なTALENベクターを用いて、オプシン5遺伝子ノックアウトマウスを作出した。まず、TALEN法によるオプシン5遺伝子変異の効率を調べるために、受精卵にTALEN RNAを顕微注入後、仮親に戻し10日胚まで成長させた。胚よりゲノムDNAを抽出し、Opn5遺伝子標的塩基配列を決定した。ファウンダーマウス(F1)において、モザイクながらも両アリルに遺伝子変異が入り、塩基の欠失によるフレームシフト変異がおり、さらに終始コドンが生じる変異が高い効率でおこった。そこで、オプシン5 TALENノックアウト F1マウスを野生型マウスに交配させ、ヘテロ変異体(13塩基欠失型)を得た。このヘテロ変異体同士を交配させ、次世代を得た(野生型、ヘテロ接合体、Opn5^{-/-}マウス)。三週齢まで観察したところ、Opn5^{-/-}マウスも他の遺伝子型と比較して、見たところ変わりなく正常に生まれ成長することがわかった。研究目的(2)については、その後、TALEN法よりさらに簡便かつ効率の高いゲノム編集技術として、CRISPR/Cas法が開発され、今後、本法を用いてレポーター遺伝子のノックインを行う予定にしている。
(2)非哺乳類で4つめのオプシン5様視物質(Opn5n)について、ヒヨコ網膜を用いた免疫組織化学的解析を行った。Opn5nは、共同研究者(京都大学、七田芳則ら)により、本研究対象のOpn5mやOpn5L2(Ohuchi H et al., 2012)と異なった光吸収特性を持つことが明らかになっている(論文準備中)。この分子特性に対応するように、Opn5nタンパク質は、Opn5mやOpn5L2と異なり、古典的視細胞であ

る桿体・錐体に存在することがわかった(学会発表、)。

(3) マウスや霊長類の眼と脳におけるオプシン5の局在について、組織化学的解析を行った。これまで哺乳類型 Opn5 である Opn5m が Western プロット解析でマウス脳に存在することが明らかにされていたが、その細胞レベルでの解析は報告されていない(Kojima D et al. 2011)。まず、Opn5m mRNA の局在を in situ ハイブリダイゼーション法により明らかにして報告した(共同研究による、雑誌論文)。タンパク質レベルの局在解析についてもその予備実験結果について報告した(学会発表)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Yamashita T, Ono K, Ohuchi H, Yumoto A, Gotoh H, Tomonari S, Sakai K, Fujita H, Imamoto Y, Noji S, Nakamura K, Shichida Y. Evolution of mammalian Opn5 as a specialized UV-absorbing pigment by a single amino acid mutation. J Biol Chem, 査読有、289 巻、2014, 3991-4000

Inoue J, Ueda Y, Bando T, Mito T, Noji S, Ohuchi H. The expression of LIM-homeobox genes, Lhx1 and Lhx5, in the forebrain is essential for neural retina differentiation. Dev Growth Differ, 査読有、55 巻、2013, 668-675

Ohuchi H. Molecular aspects of eye evolution and development: from the origin of retinal cells to the future of regenerative medicine. Acta Medica Okayama, 査読有、67 巻、2013, 203-212
Kawaue T, Okamoto M, Matsuyo A, Inoue J, Ueda Y, Tomonari S, Noji S, Ohuchi H. Lhx1 in the proximal region of the optic vesicle permits neural retina development in the chicken. Biol Open, 査読有、1 巻、2012, 1083-1093

Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Horch HW, Hamaguchi N, Nakamura T, Bando T, Ohuchi H, Yamamoto T, Noji S, Mito T. Non-transgenic genome modifications

in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. Nat Commun, 査読有、3 巻、2012, 1017, doi: 10.1038/ncomms2020

Ohuchi H. Wakayama Symposium: epithelial-mesenchymal interactions in eyelid development. Ocul Surf, 査読有、10 巻、2012, 212-216

[学会発表](計15件)

加藤睦子、小野勝彦、山下高廣、片山智望、佐藤恵太、藤田洋史、板東哲哉、近藤洋一、七田芳則、大内淑代、Immunohistochemical analysis of opsin 5, an ultraviolet-absorbing photopigment, in chicken and mouse neural tissues, 第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同年会、2015.3.21-23, 神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)

井上順治、藤田洋史、板東哲哉、近藤洋一、公文裕巳、大内淑代、Comprehensive expression pattern analysis of a tumor suppressor gene, REIC/Dkk3 in the mouse, 第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同年会、2015.3.21-23, 神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)

河野仁美、泰江章博、石丸善康、井上順治、渡辺崇人、板東哲哉、親泊政一、野地澄晴、三戸太郎、田中栄二、大内淑代、CRISPR/Cas システムによる Pax6 遺伝子破壊マウスの解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014.11.25-27, パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

佐藤恵太、山下高廣、大内淑代、友成さゆり、竹内敦子、藤田(柳林)彩理、酒井佳寿美、今本泰、野地澄晴、和田昭盛、七田芳則、Molecular properties of Opn5L1, a photoreceptor protein found in non-mammalian vertebrates, 16th International Conference on Retinal Proteins, 2014.10.5-10, 長浜ロイヤルホテル(滋賀県、長浜市)

大内淑代、杉山崇、藤田洋史、加藤睦子、河野仁美、板東哲哉、Studies of Opsin

3-related proteins implicate the presence of novel photoreceptors in the chicken retina, 第55回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2014.9.27-28, 松本市中央公民館(長野県、松本市)

佐藤恵太、山下高廣、大内淑代、友成さゆり、湯本茜、柳林彩理、酒井佳寿美、野地澄晴、七田芳則、非哺乳類脊椎動物が持つ光受容タンパク質 Opn5L1の光不活性化、日本動物学会第85回大会、2014.9.11-13, 東北大学(宮城県、仙台市)

濱田良真、板東哲哉、大内淑代、富岡憲治、コオロギにおけるエピジェネティック因子E(z)の概日リズムおよび再生への関与、日本動物学会第85回大会、2014.9.11-13, 東北大学(宮城県、仙台市)

大内淑代、藤田洋史、井上順治、板東哲哉、Localization of the two opsin 3-related proteins implicates the presence of novel photoreceptors in the chicken retina, 第119回日本解剖学会総会・全国学術総会、2014.3.27-29, 自治医科大学(栃木県、下野市)

大内淑代、細胞の多様性を決めるしくみー眼の再生医療に向けてー、日本実験動物技術者協会第47回総会(招待講演)、2013.9.27-28, 川崎医療福祉大学(岡山県、倉敷市)

大内淑代、山下高廣、湯本茜、佐藤恵太、井上順治、友成さゆり、野地澄晴、七田芳則、新規オプシン5様視物質(cOpn5n)のニワトリ網膜における発現様式、第54回日本組織化学会総会・学術集会、2013.9.27-28, 航空会館(東京都、港区新橋)

山下高廣、大内淑代、湯本茜、佐藤恵太、友成さゆり、木下政人、野地澄晴、七田芳則、可視光感受性タンパク質 Opn5nの分子特性解析、日本動物学会第84回大会、2013.9.26-28, 岡山大学津島キャンパス(岡山県、岡山市)

山下高廣、大内淑代、友成さゆり、藤田(柳林)彩理、酒井佳寿美、野地澄晴、

七田芳則、Molecular properties of vertebrate non-visual opsins, 15th International Conference on Retinal Proteins, 2012.9.30-10.5, Ascona (Switzerland)

山下高廣、大内淑代、友成さゆり、藤田(柳林)彩理、酒井佳寿美、野地澄晴、七田芳則、脊椎動物非視覚オプシン Opn5とその類似光受容タンパク質の分子の性質の解析、第50回日本生物物理学会年会、2012.9.22-24, 名古屋大学東山キャンパス(愛知県、名古屋市)

大内淑代、山下高廣、友成さゆり、藤田(柳林)彩理、酒井佳寿美、野地澄晴、七田芳則、非哺乳類タイプのオプシン5はニワトリ光受容器官と非光受容器官の両方に存在する、第35回日本神経科学大会、2012.9.18-21, 名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)

大内淑代、山下高廣、友成さゆり、藤田(柳林)彩理、酒井佳寿美、野地澄晴、七田芳則、A non-mammalian type opsin 5 functions dually in the photoreceptive and non-photoreceptive organs of birds. 第14回国際細胞組織化学会議、2012.8.26-29, 京都国際会議場(京都府、京都市)

[図書](計3件)

大内淑代、朝倉書店、「脳内光受容体」光と生命の事典(真嶋哲朗、飯野盛利、七田芳則、藤堂剛編集、分担執筆)、2016(印刷中)

渡辺崇人、三戸太郎、大内淑代、野地澄晴、羊土社、実験医学別冊 今すぐ始めるゲノム編集(山本卓編、分担執筆) 2014, 149-158

大内淑代、野地澄晴(共訳) 丸善出版、ルイス・ウォルパート著「発生生物学(サイエンスパレット)生物はどのように形づくられるか」、2013, 181

6. 研究組織

(1)研究代表者

大内 淑代 (OHUCHI, Hideyo)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：00253229

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
研究申請書には記載していなかったが、次の研究者との連携で当研究を遂行した。

板東 哲哉 (BANDO, Tetsuya)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：60423422
(平成25年度より連携研究者)

藤田 洋史 (FUJITA, Hirofumi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：20423288

泰江 章博 (YASUE, Akihiro)
徳島大学・大学院 HBS 研究部・講師
研究者番号：80380046

(4)研究協力者
井上 順治 (INOUE, Junji)
(平成25年度より研究協力者)

加藤 睦子 (KATO, Mutsuko)
(平成26年度、研究協力者)