

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840120

研究課題名(和文)暗所視を可能にする光受容タンパク質の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular properties of visual pigments suitable for scotopic vision

研究代表者

櫻井 啓輔 (SAKURAI, Keisuke)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：20647317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ロドプシンと錐体視物質の性質の違いが視細胞の光応答特性に果たす役割について検証する為、ニワトリ緑色感受性錐体視物質がロドプシン遺伝子座に導入されたノックインマウス視細胞を電気生理学的に調べた。その結果、ホモ体視細胞では野生型に対して有意なノイズの増大が観察された。次に、ヤツメウナギ網膜の桿体・錐体視細胞から光応答を測定した結果、桿体視細胞は錐体視細胞に比べ、約30倍光感度が高いことが分かった。さらに、暗所視にかかわる視物質の分子的基盤を検証する為、錐体視物質変異体がアカハライモリ網膜に発現するトランスジェニック個体を作成し、解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：Firstly, to elucidate how the property of high thermal stability of vertebrate rhodopsins is acquired during the process of molecular evolution of visual pigments, we carried out physiological analyses on chicken green cone opsin knockin mice. We found that current fluctuation in darkness of homozygous rods was considerably higher than that of wild type rods, suggesting that thermal stability of the chicken green cone opsin is extremely lower than that of rhodopsin. Secondly, we carried out single-cell recordings from isolated retina of a dark-adapted lamprey. Sensitivity of the lamprey rods was about 30 times higher than that of lamprey cones and the kinetics in the rods were considerably slower than those of the cones as observed in other vertebrate animals. Finally, we have introduced DNA vectors to express mutant cone opsins in newt photoreceptors. We confirmed that the mutant cone opsins were ectopically expressed in the newt photoreceptors.

研究分野：動物生理学

キーワード：視細胞 オプシン 桿体 錐体 アカハライモリ ノックインマウス ヤツメウナギ

1. 研究開始当初の背景

広範囲な光環境下で生物が物を認識することが出来るのは、網膜には二種類の光受容細胞—錐体視細胞と桿体視細胞—が存在し、両視細胞がそれぞれ明るい所での視覚「明所視」と、暗い所での視覚「暗所視」という、異なる光環境下で機能している。それに伴い、錐体は光応答の素早いON/OFF、桿体は高い光感度という異なる光応答特性を示すことが知られている。このような異なる光応答特性の背景に存在するメカニズムを明らかにすることは、生物の優れた視覚機能を理解する上で重要な課題であり、これまで分子的観点から精力的に研究が行われてきた。興味深いことに、視細胞内に存在する光シグナル伝達過程を桿体と錐体と比較すると、それぞれ相同な遺伝子グループに属するタンパク質で構成されていることが知られている。この知見から、両視細胞は進化的に共通の祖先型視細胞から派生し、光環境に適応する過程で、細胞内の分子的性質が変化し、現在の様に異なる光応答特性を示すようになったと考えられている。

光シグナル伝達系の最上流に位置する視物質のアミノ酸配列を元にした分子系統樹から、祖先型視物質からまず4つの錐体視物質グループ(L、S、M1、M2グループ)へ分岐し、その後、1つの桿体視物質(ロドプシン)グループが出現したと考えられている。錐体視物質の4つのグループへの分岐は、異なる波長を弁別する色覚の獲得に重要である。一方、桿体視物質(ロドプシン)グループの分岐は、桿体視細胞の暗い環境下で光を受容する働きに関与すると考えられている。我々の先行研究により一つの錐体光受容タンパク質グループ(Lグループ)では、ロドプシンに比べ約1,000倍もタンパク質が熱的に不安定であり、これが、生物が「暗所視」を獲得するのに重要な要因であることが明らかとなった。視物質の熱安定性という性質は、暗所下での視覚において重要であることが明らかとなったが、このような視物質の性質がどのような進化過程で獲得されたのか、また、このような性質をもたらす分子的基盤を明らかにすることは重要な課題である。

2. 研究の目的

両視細胞の生理機能が光環境に適応した進化プロセスを明らかにすると共に、視物質の熱安定性を制御する分子的基盤の解明を目指し、本研究では次の3つの研究を行なった。

- (1)ロドプシングループと進化的に近縁な錐体視物質の熱安定性の解明
- (2)進化的中間状態に位置する視物質(ヤツメウナギロドプシン)の熱安定性の解析
- (3)視物質の熱的安定性を制御する分子的基盤(アミノ酸残基)の探索

3. 研究の方法

- (1)分子進化的に5つのサブグループに分

類される視物質の中で、桿体視物質(ロドプシン)グループの分岐が、明所視・暗所視という視覚機能の違いをもたらしたという仮説を証明する為に、分子系統樹上でロドプシングループと最も近縁なグループ(M2グループ)に属する錐体視物質(具体的には、ニワトリの緑色感受性錐体視物質。以下、ニワトリ緑)をロドプシン遺伝子座に導入したノックインマウスを駆使して、桿体視細胞に異所発現させた錐体視物質の熱安定性を単一視細胞測定法により解析した。マウスの緑色感受性錐体視物質(マウス緑)がロドプシンより暗状態において約1,000倍不安定であることが申請者らの研究からわかっていたが、マウス緑はロドプシングループに対し最も遠縁なLグループに属している。そのため、この錐体視物質Lグループでわかった熱安定性の違いは、全ての錐体視物質グループに共通した性質なのか分かっていなかった。この課題を明らかにするため、M2グループに属するニワトリ緑遺伝子をロドプシン遺伝子座に導入したノックインマウスを用いて、M2グループ視物質とロドプシングループの生理的条件下での熱安定性の違いを検証した。

(2)脊椎動物の視物質のアミノ酸配列をもとにした分子系統樹では、視物質は5つのグループに分類されるが、これらの5グループに属する視物質遺伝子は、最も原始的な脊椎動物とされる無顎類に存在している。つまり、視物質遺伝子の分岐は、脊椎動物が誕生した初期段階で起こっていたと考えられる。ところが、興味深いことに、ヤツメウナギロドプシンは他の脊椎動物のロドプシンと異なり、桿体と錐体視物質の中間状態の生化学的性質を持つことから、熱的安定性も他の脊椎動物とは異なる可能性が考えられる。本研究では、ヤツメウナギの桿体視細胞に発現するロドプシンの熱安定性を明らかにする為、ヤツメウナギの桿体視細胞を電気生理学的手法により解析した。

(3)進化的にどのようなプロセスを経て視物質の熱安定化がもたらされたのかを明らかにすると同時に、その背景にある分子メカニズムを理解することは重要な課題である。そこで、視物質の熱的活性化を制御するタンパク質の分子基盤を解明する為に、熱安定性にかかわるアミノ酸残基の探索を行った。そして、視物質の性質決定に重要と考えられる候補アミノ酸残基を置換した赤錐体視物質を、アカハライモリの桿体視細胞に異所発現させ、細胞応答のノイズ解析を行う。まず、視物質の熱的安定性にかかわると考えられるアミノ酸残基を置換した赤色錐体視物質を桿体視細胞に異所発現するトランスジェニックイモリの作製を試みた。そして、トランスジェニックイモリの桿体視細胞を電気生理学的に測定することにより、熱安定性に重要なアミノ酸残基を同定することを目指した。

4. 研究成果

(1) ロドプシンと錐体視物質の性質の違いが視細胞の光応答特性に果たす役割について検証する為、ニワトリ緑を相同組換え法によりロドプシン遺伝子座に導入したノックインマウスの電気生理学的解析を行った。野生型とニワトリ緑ホモ体の3週齢マウスにおいて、桿体視細胞の光応答を吸引電極法により測定した。500nmの単色光のフラッシュ光刺激に対する光感度を比較した結果、ニワトリ緑ホモ体は野生型に対して1/2.6倍に低下を示した。また、視物質一分子の光反応で発生する応答の大きさは、野生型で0.53 pAであったのに対し、ニワトリ緑ホモ体で0.22 pAであった。つまり、単一光子応答の振幅に関しては、野生型に対してニワトリ緑ホモ体は約1/2.5倍小さい値を示した。さらに、光応答の速度を比較したところ、ピークに達するまでの時間は野生型で159 msであったのに対し、ニワトリ緑ホモ体で145 msとホモ体の方が有意に短くなった。次に、暗条件で外節に流れる電流のノイズを、野生型とニワトリ緑ホモ体で比較した。その結果、ニワトリ緑ホモ体では野生型に対して有意なノイズの増大が観察された。さらに、ノイズの成分を詳細に解析したところ、暗時におけるニワトリ緑の熱安定性は、ロドプシンに比べると460倍不安定であることが分かった。この結果は、視物質の高い熱安定性は、ロドプシングループが錐体視物質グループから分岐した後に獲得された特性であることが示唆された。

(2) カワヤツメの成体の網膜には、細胞の形態学的な特徴から分類できる錐体視細胞と桿体視細胞の2種類が存在する。これまでヤツメウナギ網膜の組織レベルでの光応答に

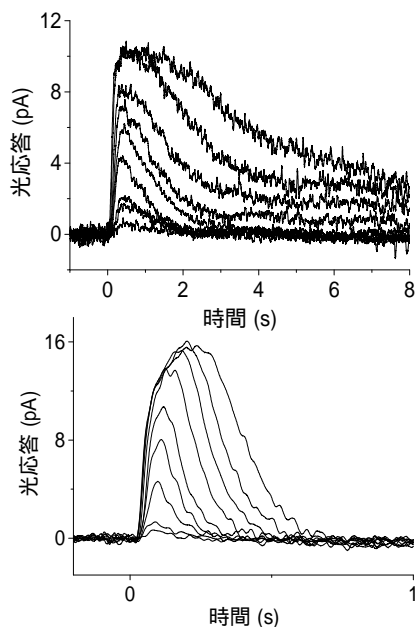


図 ヤツメウナギ桿体(上)と錐体(下)視細胞の光応答

関して組織レベルで解析した報告例があったが、視覚機能の解明には細胞レベルでの解析が必要であった。本研究では、ヤツメウナギ視細胞の光応答を単一視細胞レベルで電気生理学的記録に成功した(図)。暗順応させたヤツメウナギ網膜から単離した組織を用い、桿体と錐体視細胞の光感度と応答を調べた。その結果、ヤツメウナギ桿体視細胞の光感度はヤツメウナギ錐体視細胞に比べて約30倍高いことが分かった。興味深いことに、ヤツメウナギ桿体視細胞の単一光子応答の振幅は小さく、他の脊椎動物の桿体視細胞に特徴的な単一光子の検出能が、ヤツメウナギには備わっていないことが示された。この結果は、暗所での視覚は、進化的に顎口類が誕生した後に獲得された可能性を示唆している。今後、この可能性をさらに詳細に検証する為に、ヤツメウナギ桿体視細胞の暗ノイズを測定しヤツメウナギロドプシンの熱安定性の検証を行う。

(3) アカハライモリの桿体視細胞に、ヒト赤色感受性錐体オプシンの変異体を発現させる為の導入ベクターの構築を行った。オプシン変異体は、ヒト赤錐体視物質遺伝子の122番目グルタミン残基をグルタミン酸残基に、189番目のプロリン残基をイソロイシン残基に置換した点変異体を用意し、その下流に、IRES、蛍光タンパク質、を連結したベクターを構築した。さらに、構築したベクターをイモリ受精卵に注入し、トランスジェニックアカハライモリの作製を行った。その結果、導入した蛍光タンパク質の発現を示すトランスジェニック個体が得られた。今後、トランスジェニックイモリの桿体視細胞から電気生理学的に光応答を測定することにより、暗所視にかかわる視物質の分子的基盤の解明が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Keisuke Sakurai, Jeannie Chen, Shahrokh C Khani, Vladimir J Kefalov
Regulation of mammalian cone phototransduction by recoverin and rhodopsin kinase, *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, Vol.290(4), 2015, 9239-9250,
DOI:10.1074/jbc.M115.639591

Wen-Tao Deng, Keisuke Sakurai, 以下12名省略, Cone phosphodiesterase-6 restores rod function and confers distinct physiological properties in the rod phosphodiesterase-6-deficient rd10 mouse, *The Journal of Neuroscience*, 査読有, Vol.33(29), 2013, 11745-11753,
DOI:10.1523/JNEUROSCI.1536-13.2013

[学会発表](計5件)

櫻井 啓輔、Key elements controlling the duplex vision on vertebrate evolution、大阪大学国際シンポジウム、2015 年 3 月 20 日、大阪大学豊中キャンパス ホール (大阪府豊中市)

櫻井 啓輔、大西 暁士、今井 啓雄、千坂 修、山下 高廣、中谷 敬、七田 芳則、Physiological analyses of mouse rods expressing chicken green cone opsin、第 16 回レチナル蛋白質国際会議、2014 年 10 月 7 日~2014 年 10 月 11 日、長浜ロイヤルホテル (滋賀県長浜市)

櫻井 啓輔、大西 暁士、今井 啓雄、千坂 修、山下 高廣、中谷 敬、七田 芳則、ニワトリ緑錐体視物質ノックインマウスの暗ノイズ解析、第 18 回日本光生物学協会年会、2014 年 8 月 22~8 月 23 日、大阪市立大学杉本キャンパス (大阪府大阪市)

櫻井 啓輔、大西 暁士、今井 啓雄、千坂 修、山下 高廣、中谷 敬、七田 芳則、Physiological role of M2-group cone visual pigments on photoresponse in chicken green knock-in mice、ARVO 年会、2014 年 5 月 4 日~2014 年 5 月 8 日 オーランド (米国)

櫻井 啓輔、大西 暁士、今井 啓雄、千坂 修、山下 高廣、中谷 敬、七田 芳則、ニワトリ緑色感受性錐体視物質を桿体視細胞に発現させたノックインマウスの単一視細胞応答、第 84 回日本動物学会年会 2013 年 9 月 26 日~2013 年 9 月 28 日、岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 啓輔 (SAKURAI, Keisuke)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：20647317