

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840122

研究課題名(和文) 哺乳動物が環境光を感知するためのメラノプシンの分子特性の解明

研究課題名(英文) Analyses of molecular characteristics in mammalian melanopsins to receive ambient light signals.

研究代表者

塚本 寿夫 (TSUKAMOTO, Hisao)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・助教

研究者番号：90579814

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)：哺乳類は、他の多くの動物と同様に、外界の光環境に応じて、概日時計の調節などを行う。このような哺乳類における、「視覚外」の環境光受容には、網膜内の視細胞と共に、網膜神経節細胞が関与することが知られている。この網膜神経節細胞の光受容は、メラノプシンというタンパク質が担っている。本研究では、哺乳類メラノプシンが、環境光受容を担うために特徴的な分子特性を持っているのではないかと考え、種々の哺乳類メラノプシンと分子系統的に近縁な他の光受容タンパク質との間で分光学的・生化学的な性質を比較した。その結果、哺乳類メラノプシンが、環境光を受容するために適した分子特性を持つことを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：As other animals, mammals receive ambient light signals to regulate their circadian clocks. Such a "non-visual" photoreception in mammals is mediated by not only visual photoreceptor cells but also intrinsically retinal ganglion cells. A photoreceptive protein named melanopsin receives and transmits the light signals in the intrinsically retinal ganglion cells. In this study, we compared biochemical and spectroscopic properties of mammalian melanopsins with those of closely related photopigments with an aim to identify some molecular characteristics in mammalian melanopsins suited for the non-visual photoreception. Our data suggested that mammalian melanopsins have acquired some characteristics to receive ambient light signals.

研究分野：光生物学

キーワード：光受容 ロドプシン 分子進化 レチナール

1. 研究開始当初の背景

多くの動物は、外界の光を視覚のみならず、体内時計(概日時計)の調節など「非視覚」の光受容にも用いている。ヒトなど哺乳類の場合、網膜内において、視覚を担う桿体・錐体視細胞に加えて、網膜神経節細胞が環境光を受容することで、概日時計の調節や瞳孔反射が起こることがこれまでにわかっている。桿体・錐体視細胞では、オプシンとよばれる、7回膜貫通構造を持った膜タンパク質(Gタンパク質共役受容体)が光を受容する役割を果たしている。具体的には、オプシンタンパク質にビタミンAの誘導体であるレチナールが発色団として結合することで、可視光の受容が可能となっている。

近年、非視覚の光受容を担う網膜神経節細胞においても、メラノプシン(あるいはOpn4)と名付けられた、視細胞で機能するオプシンとは異なる遺伝子にコードされるが、同じファミリーに属するオプシンの一種が光受容を担うことが示された。興味深いことに、メラノプシンは、オプシンファミリーの中で、哺乳類など脊椎動物の視細胞ではたらくオプシンよりもむしろ、イカやショウジョウバエなど無脊椎動物の視細胞で機能するオプシンに近縁である(図1)。このことは、メラノプシンが無脊椎動物の視覚を担うオプシンと似た分子特性を持つことを示唆している。実際、両者には、光受容に伴いGqタイプのGタンパク質を活性化するなどの共通点が存在する。その一方で、特定の事物を高い時空間分解能で感知する視覚と、外界の光環境を広く、長時間積算して検知する非視覚の光受容は、大きく異なる機能でもあるため、哺乳類のメラノプシンは、環境光を受容するために特化した、視覚を担うオプシンとは異なる分子特性を持つとも考えられるが、その詳細はわかっていなかった。

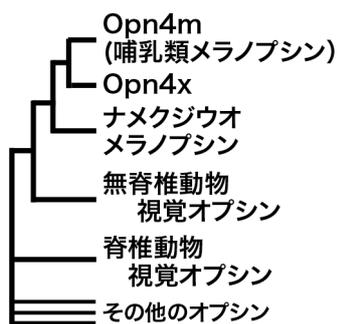


図1: メラノプシンと他のオプシンとの分子系統関係の模式図

2. 研究の目的

哺乳類メラノプシンが、「非視覚」の環境光受容を担うために、どのような分子特性を分子進化の過程で獲得してきたのかを、明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

これまでに研究代表者らが確立してきた、

様々なオプシンやイオンチャネルなど他の膜タンパク質について哺乳培養細胞を用いて大量発現・精製する技術を駆使することで、様々な哺乳類のメラノプシンの精製タンパク質を大量調製する。また、哺乳類メラノプシンの分子特性を比較する対象として、頭索類(無脊椎動物)ナメクジウオが持つメラノプシンや、上述したようにメラノプシンと近縁な無脊椎動物の視覚を担うオプシンとして、鋏角類ハエトリグモロドプシンを同じ条件で調製した。それらの精製オプシン試料について、分光学的・生化学的性質を比較して、哺乳類メラノプシンが持つ特徴的な分子特性を特定することを試みた。また、原始的形質を保持した脊椎動物と考えられている円口類ヤツメウナギが持つメラノプシン(哺乳類メラノプシンに近縁)の分光学的特性についても解析を行った。さらに、解析を行った結果、哺乳類メラノプシンの中でも分子特性の違いがあることが明らかになったので(4.研究成果の(1)項参照)、この違いが細胞応答レベルにも影響することを検証するために、異なる分子特性を示すマウスとヒトのメラノプシンについて、アフリカツメガエルの卵母細胞に強制発現させたときの、光応答特性を電気生理学的に解析し、その結果を比較した。

4. 研究成果

(1) 哺乳類メラノプシンがもつ特徴的な分子特性の特定

精製したマウスとヒトのメラノプシンを、暗において哺乳類の体温に近い37℃に保持したところ、経時的に、発色団レチナールとの結合が自発的に切断されていくことを見出した。対照的に、ナメクジウオメラノプシンやハエトリグモロドプシンを37℃で保持しても、レチナールとの結合はほとんど切断されなかった。これらの結果は、哺乳類メラノプシンにおいて、レチナールとの結合が「弱く」なっており、これが自発的に切断されることが、分子の特徴となっていることを示唆していた。また、ヒトとマウスのメラノプシンの間でも、発色団レチナールとの結合の「弱さ」が大きく異なっていた。具体的には、ヒトのメラノプシンにおいてレチナールとの結合がより弱くなっており、マウスメラノプシンと比べて8倍程度、37℃における寿命が短くなることを見出した。

このような「弱い」レチナールとの結合が、他の哺乳類のメラノプシンにおいても見られるのか検証するために、最近のゲノム解析から見出された種々の霊長類のメラノプシンのうち3つ(ガラゴ、ヒヒ、リスザル)について、同様の解析を行った。その結果、これらの3種類のメラノプシンについても自発的なレチナールとの結合の崩壊が見られた。さらに、ヒトを含めた霊長類メラノプシンの中でもレチナールとの結合の安定性が大きく異なり、一番弱いガラゴと強いヒヒのメラ

ノプシンでは、37 °Cにおける寿命が 10 倍程度異なることも見出した。

次に、このような哺乳類メラノプシンにおける、レチナルとの結合の安定性の違いがどのように生み出されているのかを明らかにするために、各種の哺乳類メラノプシンについて部位特異的変異を導入した際の影響を調べた。その結果、哺乳類メラノプシンの中で、比較的レチナルとの結合が強いマウス・ヒヒのメラノプシンと、弱いヒト・ガラゴのメラノプシンでは細胞外領域のアミノ酸配列の違いによって、安定性の違いのほとんどが生み出されていることがわかった。細胞外領域のアミノ酸配列を、種々の哺乳類のメラノプシン間で比較してみると、哺乳類メラノプシンの祖先型は、マウスメラノプシンと同等程度に比較的レチナルとの結合が安定であり、分子進化の過程で、結合を不安定化させるアミノ酸置換が特定の箇所に平行して繰り返し起こることで、哺乳類間でのメラノプシンにおけるレチナルとの結合が多様化してきたことが示唆された。また、ヒトを含めた類人猿のメラノプシンでは、レチナルとの結合を不安定化するアミノ酸残基が保存されており、類人猿において、メラノプシンがレチナルを放出しやすくなっていることが重要であることが示唆された。

以上の結果をまとめると、もともと非常に安定であったレチナルとの結合が、哺乳類メラノプシンの形成に伴いある程度不安定化され、さらに哺乳類メラノプシンの多様化の過程で、レチナルとの結合の熱安定性も多様化し、霊長類メラノプシンでは不安定化された状態が保持されているという分子進化過程が考えられた (図 2)。

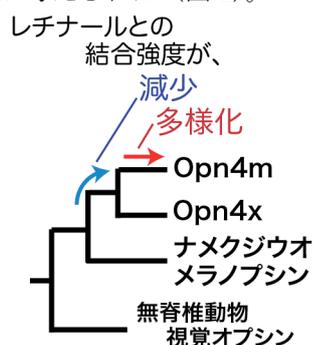


図2: 得られた結果から推測される哺乳類メラノプシンの分子進化過程

(2) 円口類ヤツメウナギが持つ「哺乳類型」メラノプシンの分光学的特性の解析

分子系統樹上で、メラノプシンは大きく 2 種類に分類される。その 2 種類のメラノプシンはそれぞれ、Opn4m (mammal 型) と Opn4x (Xenopus 型) とよばれている (図 1 参照)。哺乳類以外の脊椎動物の多く (鳥類・両生類など) は Opn4x と Opn4m の両方を持つが、哺乳類は Opn4m のみを持つ。興味深いことに、円口類ヤツメウナギでは、これまでに

Opn4m タイプのメラノプシンのみが見出されている。大阪市立大学の孫蘭芳博士・小柳光正准教授・寺北明久教授らは、ヤツメウナギメラノプシンの局在部位ならびに生理機能などを調べていた。

このヤツメウナギメラノプシンが、他のメラノプシンと類似あるいは異なる分子特性を持つかどうかを明らかにするために、このメラノプシンがどのような色の光を受容するのか、精製タンパク質を用いて解析を行った。その結果、ヤツメウナギメラノプシンは他のメラノプシンと同様に 480 nm 付近の青緑色の光を受容することを見出した (5. 主な発表論文等の雑誌論文の②)。ヤツメウナギのメラノプシンが Opn4m と Opn4x の分岐以前の分子特性を保持しているのかどうかは、今後さらなる解析が必要である。

(3) 細胞内におけるヒトメラノプシンとマウスメラノプシンのレチナル放出しやすさの違い

上述のように、精製タンパク質を用いた解析から、マウスとヒトのメラノプシンでは、ヒトのメラノプシンのほうがレチナルの結合が切れやすいことが示された。このような違いが、細胞応答レベルでも見られるのかどうかを明らかにするために、生理学研究所の久保義弘教授と共同して、ヒトとマウスのメラノプシンをアフリカツメガエルの卵母細胞に強制発現させて、光を照射したときの細胞応答を比較した。もし、細胞内でもヒトメラノプシンとレチナルとの結合が切断されやすいとすると、細胞外液にレチナルと競合的にメラノプシントタンパク質に結合するアンタゴニスト (光に非感受性) を添加した場合に、レチナルとアンタゴニストが交換されて、レチナルを結合したメラノプシンが Gq を光依存的に活性化することによって生じる電流量が小さくなると考えられる。

実際に、ヒトあるいはマウスのメラノプシンを発現させた卵母細胞に、まずレチナルを添加し、その後アンタゴニストを添加したものとしなかったものを、37 °C で 90 分保持した。その後、光応答電流を比較したところ、ヒトメラノプシンを発現させた卵母細胞においてのみ、アンタゴニストを添加したときに有意な電流量の減少が見られた。この結果は、精製した条件のみならず、細胞膜環境においても、ヒトメラノプシンのほうが、レチナルとの結合が弱いことを示している。

以上の解析から得られた結果は、発色レチナルとの結合が弱いことが、哺乳類メラノプシンが持つ特徴的な分子特性であることを示している。では、レチナルとの結合が弱いことが、メラノプシンの機能である環境光受容にどのように貢献しているのだろうか? これまでにマウスを用いた解析から、メラノプシンが機能する網膜神経節細胞は、光

感度が視細胞と比べて1万倍以上低く、このことが環境光を広い時空間において飽和することなく受容するために重要であることが示されている。さらに、その低い光感度は細胞内のメラノプシン密度が低いことによって生じていることも提唱されている。今回得られた結果は、哺乳類メラノプシンがレチナールとの結合を自発的に切ることで、網膜神経節細胞中の光受容能を持ったメラノプシン分子の数を減らすことに寄与していると考えられる。さらに、ヒトなど類人猿のメラノプシンは、レチナールとの結合を一層弱めることで、網膜神経節細胞の光感度をさらに低下させ、明るい光環境で生活することによる強い光入力に適応しているのかもしれない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4件)

① Inaguma A, Tsukamoto H, Kato HE, Kimura T, Ishizuka T, Oishi S, Yawo H, Nureki O, Furutani Y.

Chimeras of Channelrhodopsin-1 and -2 from *Chlamydomonas reinhardtii* Exhibit Distinctive Light-induced Structural Changes from Channelrhodopsin-2.

J. Biol. Chem. 2015, **290**, 11623-11634.

doi: 10.1074/jbc.M115.642256

査読あり

② Sun L, Kawano-Yamashita E, Nagata T, Tsukamoto H, Furutani Y, Koyanagi M, Terakita A.

Distribution of mammalian-like melanopsin in cyclostome retinas exhibiting a different extent of visual functions.

PLoS One 2014, **9**, e108209.

doi: 10.1371/journal.pone.0108209

査読あり

③ 塚本寿夫

Gタンパク質共役受容体オプシンとその構造的活性化変異体の構造ダイナミクス

生物物理 2014, **54** 111-112.

doi: 10.2142/biophys.54.111

査読あり

④ Tsukamoto H, Farrens DL.

A constitutively activating mutation alters the dynamics and energetics of a key conformational change in a ligand-free G protein-coupled receptor.

J. Biol. Chem. 2013, **288**, 28207-28216.

doi: 10.1074/jbc.M113.472464

査読あり

[学会発表] (計 6件)

① Hisao Tsukamoto, David L. Farrens.

Energetics and conformational dynamics

underlying the activation of the G protein-coupled receptor opsin assessed by site-directed fluorescence labeling and nanodisc techniques.

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)

② 塚本寿夫、中條浩一、久保義弘、古谷祐詞

ATR-FTIR spectroscopic analyses of interaction modes underlying unique ion selectivity of a two-pore domain potassium channel TWIK-1.

第52回日本生物物理学会年会、2014年9月

25日~27日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

③ 塚本寿夫、久保義弘、David L. Farrens、小柳光正、寺北明久、古谷祐詞

ヒトメラノプシンとマウスメラノプシンの違い

日本動物学会第85回大会、2014年9月11日~13日、東北大学 (宮城県・仙台市)

④ 塚本寿夫、David L. Farrens、久保義弘、小柳光正、寺北明久、古谷祐詞

哺乳類メラノプシンが持つ分子特性とそれが生み出されるメカニズム

平成25年度日本生物物理学会中部支部講演会、2014年3月6日、岡崎カンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)

⑤ 塚本寿夫、中條浩一、久保義弘、古谷祐詞

哺乳類 two-pore 型カリウムチャネル TWIK-1 の全反射赤外分光解析

第51回日本生物物理学会年会、2013年10月

28日~30日、京都国際会議場 (京都府・京都市)

⑥ 塚本寿夫、David L. Farrens、久保義弘、小柳光正、寺北明久、古谷祐詞

哺乳類メラノプシンが示す特徴的な分子特性

日本動物学会第84回大会、2013年9月26日~28日、岡山大学 (岡山県・岡山市)

[図書] (計 1件)

① Hisao Tsukamoto

Diversity and Functional Properties of Bistable Photopigments.

in "Evolution of Visual and Non-visual Pigments" (Hunt DM., Hankins MW., Collin SP., Marshall NJ., eds.) Springer, 2014

pp. 219-239

ISBN: 978-1-4614-4354-4

[その他]

分子科学研究所古谷グループウェブサイト

http://groups.ims.ac.jp/organization/furutani_g/

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚本 寿夫 (TSUKAMOTO, Hisao)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・助教

研究者番号：90579814