

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291070

研究課題名(和文)ハエトリグモの視覚・非視覚系に着目した動物のUV光利用の多様性の解析

研究課題名(英文) Investigation of the diversity of visual and non-visual UV reception in jumping spiders

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、動物の視覚と視覚以外の光感覚(非視覚)におけるUV光受容の意義や多様性を理解する目的で、ハエトリグモに着目した光感覚の分子基盤に関する研究を行った。複数種のハエトリグモおよびその外群となるクモ類の光受容タンパク質について分光学的・生化学的手法を用いて解析した結果、クモの光受容タンパク質の波長感受性の変遷とハエトリグモ特有のピンぼけを用いた奥行き知覚メカニズムの進化との関係が明らかとなった。また、ハエトリグモの非視覚に関わる光受容タンパク質が、光によって不活性化するという、一般的な光受容タンパク質とは逆の活性化様式を示すことを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular basis of photoreception mainly in jumping spiders in order to understand the biological meanings and the diversity of UV reception in visual and non-visual animal photoreception. We conducted spectroscopic and biochemical analyses of visual pigments rhodopsins isolated from several species of jumping spider and other spiders and found the relationship between the spectral sensitivities of spider rhodopsins and the evolution of depth perception mechanism unique to jumping spiders. We also analyzed a non-visual photoreceptor protein peropsin of jumping spider and revealed that peropsin acts as a dark-active, light-inactivated G protein-coupled receptor, which is totally opposite activation manner from known photoreceptor proteins.

研究分野：光生物学、分子進化学、生理学

キーワード：光生物学 紫外光 分子進化 感覚 ロドプシン GPCR

### 1. 研究開始当初の背景

光は動物にとって重要な外刺激であり、動物は光情報を視覚や概日リズムの調節などの視覚以外の光受容（非視覚系光受容）に利用している。興味深いことに、多くの脊椎動物や昆虫は、紫外（UV）光を視覚や非視覚系光受容に利用している。例えば、視覚においては色覚の一部として、非視覚においては、**下等脊椎動物の松果体で UV 光と可視光の比率の検出に利用していることなどが知られている。**さらに近年私たちは、ハエトリグモにおいて、形態視や奥行き知覚（視覚）を担う主眼に加え、非視覚機能に関わると想像される後中眼と呼ばれる眼でも UV 光受容を行っていることを強く示唆する結果を得た。これらの知見は、UV 光という特別な波長の光が、動物のさまざまな光感覚にとって、単なる明るさ以上の情報をもたらす重要な刺激であることを示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究では、動物の UV 光受容の意義や多様性を理解する目的で、視覚と非視覚の両方で UV 光を利用しているハエトリグモに注目して、光受容の分子基盤およびその生理的役割の解明を試みた。加えて、別種のクモやクモ以外の多様な動物においても同様の研究を行うことで、UV 光受容の分子基盤の多様性や進化についての知見を得ることを目指した。

### 3. 研究の方法

脊椎動物から無脊椎動物まで、動物の UV 光受容は、視物質であるロドプシンに類似した UV 光感受性の光受容タンパク質（UV 光受容タンパク質）が担っている。そこで本研究では、UV 光受容タンパク質の機能解析を通して動物の UV 光受容の多様性の理解を試みた。また、UV 光受容の意義を理解するためには可視光受容との関係を理解することが重要であるため、UV 光受容の解析と並行して、可視光受容に関しても光受容タンパク質の機能解析を行った。さらに、視覚と非視覚系光受容に着目して上記の解析を行うことで、視覚、非視覚系光受容それぞれの UV 光への要求性を調べた。実験には、主に複数種類のハエトリグモと外群として他のクモ類を用いた。また、対照として、クモ以外の動物においても、「UV 光と可視光」あるいは「視覚と非視覚」という切り口で同様の解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) クモの視物質の波長感受性とピンぼけ像にもとづく奥行き知覚メカニズムの進化との関連

ハエトリグモは、網で獲物を捕らえるクモとは異なり、徘徊して獲物を捕まえる、視覚に依存したクモである。特に、飛び掛かって獲物を捕まえるハエトリグモにとって、獲物

までの距離を正確に測るための奥行き知覚は重要な視覚機能である。近年私たちは、多層構造を持つハエトリグモの主眼網膜で機能する光受容タンパク質（視物質）の吸収スペクトルと分布を解析し、主眼の網膜の一部では、焦点を結んでいない波長の光に効率よく反応する視物質が機能しているために、常に“ピンぼけ像”を受けていること、さらに、そのピンぼけ量にもとづいて、ハエトリグモは距離を測定していることを明らかにした（Nagata et al., 2012 Science）。このことは、このユニークな奥行き知覚メカニズムには、ハエトリグモの視物質が、ピンぼけを生じるための吸収スペクトルをもつことが重要であることを示している。そこで私たちは、ピンぼけにもとづく奥行き知覚メカニズムと視物質の吸収スペクトルとの関係を理解するために、複数種のハエトリグモの視物質（Rh1）および、ハエトリグモとは異なる網膜構造を持ち、飛び掛かって獲物を捕らえない多数のクモ類の Rh1 を単離し、培養細胞発現系を用いて分光学的に吸収スペクトルを解析した。その結果、クモ類の Rh1 の吸収スペクトルの変遷と奥行き知覚メカニズムの進化との関係が明らかとなった（図 1）。

本研究の成果は、光受容タンパク質の吸収スペクトルという分子特性の変化から、どのようにして奥行き知覚という生理機能が進化したのかを理解する上で重要な知見であり、分子進化・機能進化の研究分野への波及効果が期待されるものである。

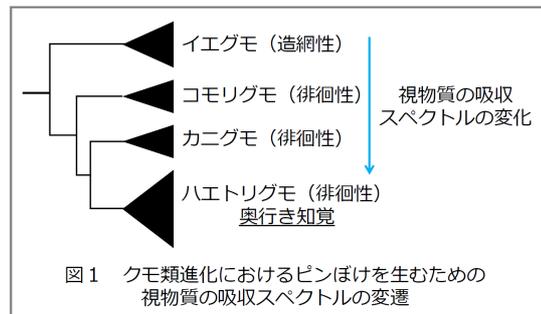


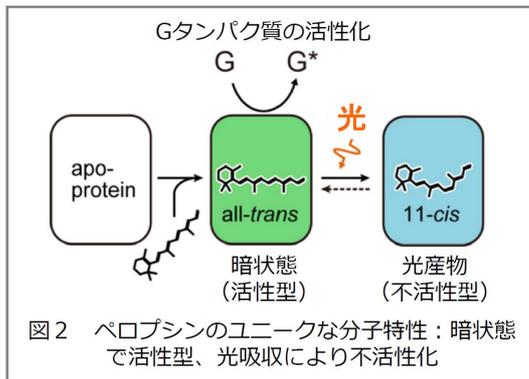
図 1 クモ類進化におけるピンぼけを生むための視物質の吸収スペクトルの変遷

(2) ハエトリグモの非視覚系光受容タンパク質（ペロプシン）が持つ視物質にはない特殊な分子特性

これまでに私たちは、ハエトリグモから、視覚に関わる 4 種類の光受容タンパク質（視物質）に加え、脳に発現が認められるペロプシンという非視覚系光受容タンパク質を見出した（Nagata et al., J. Comp. Physiol. A）。視物質に代表される一般的な光受容タンパク質は、暗状態で 11 シス型レチナールを発色団として結合しており、光吸収によって 11 シス型が全トランス型に異性化し、G タンパク質を活性化する活性型へと変化することが知られている。一方、ペロプシンは、暗状態で全トランス型レチナールを結合し、光吸収によって 11 シス型へと異性化するという、逆向きの異性化プロファイルを示した（Koyanagi et al., 2002 FEBS Lett.; Nagata et al.,

J. Comp. Physiol. A)。このことは、ペロプシンが、光によってGタンパク質を活性化する光感受性のGタンパク質共役型受容体(GPCR)ではなく、光によって11シス型レチナルを合成する光異性化酵素であることを想像させるものである。実際、ペロプシンがGタンパク質を光依存的に活性化するという報告がないこともこの考えを支持していた。今回私たちは、ハエトリグモペロプシンのGタンパク質活性化部位を、Gタンパク質を活性化することがわかっている他の光受容タンパク質の同部位と置き換えたキメラ変異体(ペロプシンキメラ)を作製し、培養細胞を用いてGタンパク質の活性化能を調べた。その結果、ペロプシンキメラは、暗状態でGタンパク質を活性化し、光吸収によってその活性化が終息(不活性化)した(Nagata et al., Sci. Rep. 2018)。このことは、ペロプシンがGPCRとしての機能し得ることを示すものであると同時に、一般的な光受容タンパク質が「暗で不活性、光で活性化」であるのに対して、ペロプシンは「暗で活性、光で不活性化」という逆の活性化様式を示す、いわば“暗受容体”として振る舞うことを示す興味深い結果である(Nagata et al., Sci. Rep. 2018、図2)。

ペロプシンは、ハエトリグモのみならず、ヒトを含む脊椎動物にも広く存在する光受容タンパク質であるが、生理的役割はほとんど明らかになっていない。私たちが発見したペロプシンの“暗受容体”として振る舞う活性化様式は、ペロプシンの生理的役割の解明の重要な手がかりになると期待される。また、近年、光受容タンパク質を用いて細胞機能やその先の生命活動を光で操作する“光遺伝学・光操作”がさまざまな生命科学研究分野において有効な技術として注目されている。私たちが予期せず見出したペロプシンの持つユニークな活性化様式は、GPCRシグナル伝達を光刺激でオフにできるこれまでにない新規光操作ツールの開発につながる可能性がある(特許出願中:特願2017-226272 永田崇, 小柳光正, 寺北明久)。

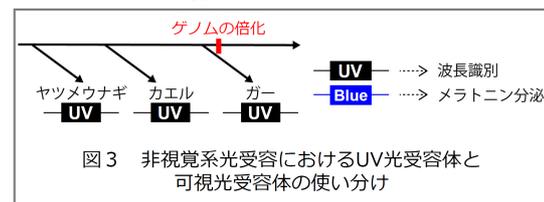


(3) 非視覚系光受容タンパク質の遺伝子重複および機能分化によるUV光と可視光との使い分け

非視覚系光受容における、UV光受容と可

視光受容との生理的・進化的関連を調べる目的で、非視覚系光受容で最も研究が進んでいる下等脊椎動物の松果体における光受容に着目した解析を行った。私たちは、松果体の波長識別に關与するUV光受容タンパク質・パラピノプシン(PP1)には、魚類の系統で遺伝子重複によって多様化したパラログ(PP2)が存在することを見出した。分光学的解析を行った結果、PP2は、UV感受性ではなく、青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(Koyanagi et al., BMC Biol. 2015)。この結果は、非視覚系光受容タンパク質が、波長感受性、すなわち“色”感受性に関して多様化したことを明確に示す初めての発見であった。さらに、この2つのパラピノプシンについて、遺伝子導入ゼブラフィッシュを用いた詳細な解析を行った結果、PP1は他の動物と同様、松果体の波長識別に關与することが示唆されたが、新規に青色感受性を獲得したPP2は松果体の別の機能であるメラトニン分泌の光制御に關与することが示唆された(Koyanagi et al., BMC Biol. 2015、図3)。

この成果は、遺伝子重複に始まるタンパク質機能の多様化と生理機能の多様化との関連を表す良い例であると同時に、非視覚系光受容においても、生理機能ごとに“色の好み”があることを示すものである(Koyanagi et al., BMC Biol. 2015; Koyanagi and Terakita, Front. Eco. Evol. 2017)。

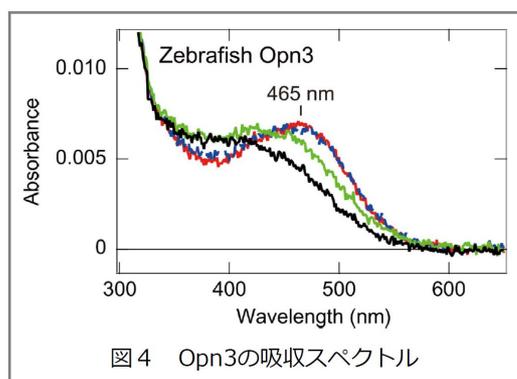


(4) 脊椎動物の非視覚系光受容タンパク質(Opn3)の分光学的特性の解明

動物の非視覚系光受容の多様性を理解する目的で、脊椎動物から無脊椎動物まで広く存在する光受容タンパク質類似遺伝子Opn3に着目した。Opn3は、内臓や哺乳類の脳など光受容器官とは考えられていない組織(非光受容器官)で発現していることからその性質に注目が集まっていたが、脊椎動物のOpn3が実際に光受容体として機能するかどうかについては疑問視されていた。そこで私たちは、培養細胞発現系を用いてさまざまな脊椎動物のOpn3の組換え光受容タンパク質の発現を試み、鳥類と魚類のOpn3の発現および精製に成功した。分光学的解析の結果、脊椎動物Opn3は青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(Sugihara et al., PLOS One 2016、図4)。一方、興味深いことに、脊椎動物Opn3は、無脊椎動物のOpn3とは光反応が異なっており、また、無脊椎動物Opn3が活性化するGi型Gタンパク質を活性化しなかった。このことは、脊椎動物のOpn3と無脊椎動物のOpn3は駆動する光情報

伝達系が異なる可能性を示唆している (Sugihara et al., PLOS One 2016)。

また、本研究では、光受容タンパク質の重要な性質である吸収スペクトルを(波長感受性)解析する新しい手法を開発した。具体的には、光受容タンパク質を発現させた培養細胞の光の波長依存的な細胞内情報伝達因子の変化を測定し、細胞応答の波長感受性を求めたところ、光受容タンパク質自身の吸収スペクトルと良く一致した (Sugihara et al., PLOS One 2016)。これまで、多くの光受容タンパク質が、タンパク質の発現量や安定性が低いために、組換え光受容タンパク質の精製・解析ができず、機能未知であったが、この新手法を用いることで、それらの機能解析の道が開けた。



## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

E. Gerrard, E. Mutt, T. Nagata, M. Koyanagi, T. Flock, E. Lesca, G. Schertler, A. Terakita, X. Deupi, R. Lucas: Convergent evolution of tertiary structure in rhodopsin visual proteins from vertebrates and box jellyfish. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA in press (2018) 査読有  
DOI: 10.1073/pnas.1721333115

T. Nagata, M. Koyanagi, R. Lucas, A. Terakita: An all-trans-retinal-binding opsin peropsin as a potential dark-active and light-inactivated G protein-coupled receptor. Scientific Reports 8, 3535 (2018) 査読有  
DOI: 10.1038/s41598-018-21946-1

R. Matsuo, Y. Takatori, S. Hamada, M. Koyanagi, Y. Matsuo: Expression and light-dependent translocation of  $\beta$ -arrestin in the visual system of the terrestrial slug *Limax valentianus*. The Journal of Experimental Biology 220, 3301-3314 (2017) 査読有  
DOI: 10.1242/jeb.162701

M. Koyanagi, E. Kawano-Yamashita, S. Wada, A. Terakita: Vertebrate Bistable Pigment Parapinopsin: Implications for Emergence of Visual Signaling and Neofunctionalization of

Non-visual Pigment. Frontiers in Ecology and Evolution 5, 23 (2017) 査読有  
DOI: 10.3389/fevo.2017.00023

T. Sugihara, T. Nagata, B. Mason, M. Koyanagi, A. Terakita: Absorption Characteristics of Vertebrate Non-Visual Opsin, Opn3. PLOS ONE 11, e0161215 (2016) 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0161215

M. Koyanagi, S. Wada, E. Kawano-Yamashita, Y. Hara, S. Kuraku, S. Kosaka, K. Kawakami, S. Tamotsu, H. Tsukamoto, Y. Shichida, A. Terakita: Diversification of non-visual photopigment parapinopsin in spectral sensitivity for diverse pineal functions. BMC Biology 13, 73 (2015) 査読有  
DOI: 10.1186/s12915-015-0174-9

E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi, S. Wada, H. Tsukamoto, T. Nagata, A. Terakita: Activation of transducin by bistable pigment parapinopsin in the pineal organ of lower vertebrates. PLOS ONE 10:e0141280 (2015) 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0141280

H. Tsukamoto, Y. Kubo, D.L. Farrens, M. Koyanagi, A. Terakita, Y. Furutani: Retinal attachment instability is diversified among mammalian melanopsins. The Journal of Biological Chemistry 290, 27176-27187 (2015) 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M115.666305

S. Kodama, Y. Kamae, M. Koyanagi, K. Tatewaki, E. Hassaneen, ASM Saifullah, T. Yoshii, A. Terakita, K. Tomioka: Green-sensitive opsin is the photoreceptor for photic entrainment of an insect circadian clock. Zoological Letters 1, 11 (2015) 査読有  
DOI: 10.1186/s40851-015-0011-6

L. Sun, E. Kawano-Yamashita, T. Nagata, H. Tsukamoto, Y. Furutani, M. Koyanagi, A. Terakita: Distribution of Mammalian-like melanopsin in cyclostome retinas exhibiting a different extent of visual functions. PLOS ONE 9: e108209 (2014) 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0108209

小柳光正: 動物の最初の視覚系を探る 細胞工学 34, 1 (2015) 査読無

小柳光正: 細胞内情報伝達分子の時空間的に精密な制御 生体の科学 65, 522-523 (2014) 査読無

小柳光正, 寺北明久: 非視覚型光受容タン

パク質 O<sub>pn3</sub> とその GPCR 研究への応用 フ  
アルマシア 50, 893-895 (2014) 査読無

〔学会発表〕(計 74 件)

M. Koyanagi: Diversity of non-visual animal opsins and their optogenetic applications. 日本比較生理生化学会第 39 回大会 (招待講演) 2017 年

M. Koyanagi, B. Shen, T. Nagata, L. Sun, S. Wada, S. Kamimura, E. Kage-Nakadai, A. Terakita: Optical regulation of cell signaling using bistable animal opsins. 2017 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES (国際学会) 2017 年

M. Koyanagi: Functional properties of diverse animal rhodopsins and their potentials for optical regulation of cell signaling. International Symposium on Biophysics of Rhodopsins (招待講演) 国際シンポジウム) 2017 年

小柳光正: Optogenetic potentials of bistable animal opsin-based pigments for regulating GPCR signaling. 第 54 回生物物理学学会年会 (招待講演) 2016 年

M. Koyanagi: Potential of bistable pigments for optical control of cell signaling. 22nd International Congress of Zoology & 87th meeting of Zoological Society of Japan (招待講演) (国際学会) 2016 年

M. Koyanagi: Optical control of cell signaling using bistable animal opsin-based pigments. 17th International Conference on Retinal Proteins (招待講演) (国際学会) 2016 年

S. Wada, E. Kawano-Yamashita, S. Tamotsu, M. Koyanagi, A. Terakita: The molecular and cellular basis of the wavelength discrimination in the zebrafish pineal organ. 17th International Conference on Retinal Proteins (国際学会) 2016 年 (The EMBO poster prize 受賞)

小柳光正: 光受容タンパク質の意外な使い方 ~ ピンぼけ像を使った奥行き知覚 ~ 第 49 回光学五学会関西支部連合講演会 (招待講演) 2015 年

M. Koyanagi: Introduction of animal rhodopsins and their optogenetic potentials. 2015 年光化学討論会 (招待講演) 2015 年

M. Koyanagi, E. Kawano-Yamashita, S. Wada, T. Nagata, A. Terakita: Activation of Transducin by Bistable Pigment Parapinopsin in the Pineal Organ of Lower Vertebrates. 2015

FASEB SUMMER RESEARCH  
CONFERENCES (国際学会) 2015 年

M. Koyanagi: Molecular properties of diverse and engineered bistable pigments and their optogenetic potential. 16th International Conference on Retinal Proteins (招待講演) (国際学会) 2014 年

M. Koyanagi: Diversity and evolution of arthropod vision revealed by the molecular basis of jumping spider vision. 日本進化学会第 16 回大会 (招待講演) 2014 年

M. Koyanagi: Wavelength sensitivity and depth perception mechanism in a jumping spider. International Society for Behavioral Ecology 2014 Conference (招待講演) (国際学会) 2014 年

〔図書〕(計 3 件)

小柳光正: 「視覚オプシンと非視覚オプシン」光と生命の事典 No.127 朝倉書店 (2016) ISBN978-4-254-17161-7

A. Terakita, T. Nagata, T. Sugihara, M. Koyanagi: Optogenetic Potentials of Diverse Animal Opsins. *In* Optogenetics p409 (p77-88) Springer (2015)  
doi:10.1007/978-4-431-55516-2\_6

E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi, S. Wada, A. Terakita: The evolution and diversity of pineal and parapineal photopigments. *In* Evolution of Visual and Non-visual Pigments p276 (p1-21) Springer (2014)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: G タンパク質シグナル伝達系を光によって抑制する光受容タンパク質  
発明者: 永田崇, 小柳光正, 寺北明久  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2017-226272  
出願年月日: 2017 年 11 月 24 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

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/>

新聞報道

産経 WEST 2015 年 9 月 23 日 “睡眠・生活リズムと光の関係...謎を解く双子遺伝子、魚類で解明”

## 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

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

蟻川 謙太郎 (ARIKAWA Kentaro)  
総合研究大学院大学・先導科学研究科・教授  
研究者番号：20167232

永田 崇 (NAGATA, Takashi)  
大阪市立大学・大学院理学研究科・特任講師  
研究者番号：90589962

### (4) 研究協力者

谷本 佳津 (TANIMOTO, Kazu)