

令和元年6月4日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02515

研究課題名(和文) Opn5が関与する非視覚機能の探索

研究課題名(英文) Exploring of non-visual functions mediated by Opn5.

研究代表者

七田 芳則 (SHICHIDA, Yoshinori)

立命館大学・総合科学技術研究機構・教授

研究者番号：60127090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,500,000円

研究成果の概要(和文)：動物の光受容に関与するオプシン類は、分子進化の過程で様々に多様化し、新奇な光受容機能の獲得に関与している。我々は、独自に研究を始めたOpn5グループが脊椎動物において4つのサブグループ(Opn5L1、Opn5L2、Opn5m、Opn5n)に分岐していることを発見した。また、それぞれのグループに含まれるオプシンの分子特性を解析するとともに、Opn5L1およびOpn5nについてはノックアウト動物の作製により、それらの生理機能を同定した。さらに、Opn5グループと同様に脊椎動物で多様化している視覚オプシンのグループについて、分子特性や機能分担に関する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は2つに大別される。1つは、動物における視覚・非視覚機能の広範な多様性について、分子レベルでのメカニズムの理解につながる。これにより、ヒトに至る高度な視覚・非視覚機能の元になる進化を分子レベルで明らかにすることができる。もう1つは、光受容タンパク質を光操作ツールとして利用するオプトジェネティクスへの応用である。これにより、脳機能や各種の生物機能の解明に最適な光操作ツールを提供することができる。

研究成果の概要(英文)：Animal photoreceptor proteins, opsins, have been widely diversified to acquire various new physiological functions in the course of molecular evolution. In this study, we found that the Opn5 group, which we started to study independently, has diversified into four subgroups (Opn5L1, Opn5L2, Opn5m, Opn5n) in vertebrates. The detailed molecular properties of opsins in four subgroups were elucidated, and the physiological functions of Opn5L1 and Opn5n were identified by generation of knockout animals. Furthermore, we obtained insights into the molecular properties and functional diversification of visual opsin group that was as diversified as Opn5 group in vertebrates.

研究分野：視覚の分子生理学・生物物理学

キーワード：光受容 オプシン 機能多様性 分子メカニズム モデル動物

1. 研究開始当初の背景

動物の光受容に關与するオプシン類は、分子進化の過程で様々に多様化し、新規な光受容機能の獲得に寄与している。これまでに 27,000 以上の遺伝子が同定され、少なくとも 7 つのグループに分類されることがわかっている。研究代表者は、これらオプシン類の分子特性および分子進化過程を解析し、オプシン類はその進化過程でアミノ酸変異により新たな分子特性を獲得し、それが、動物の新奇な機能獲得に關与してきたことを示した。実際、先祖型から現在の脊椎動物への進化過程で、視覚オプシンの G タンパク質活性化能が大きく増加し、無脊椎動物とは異なる視覚系を獲得したこと、また、脊椎動物の視覚オプシンはまず昼間視・色覚に關与する 4 つの錐体視物質のグループに分岐し、その後、明暗視に關与するロドプシンが生成してきたことを示した。一方、研究代表者は、遺伝子は発見されていたが機能解析が行われていなかった Opn5 グループについて、世界で初めてリコンビナント体を作製することに成功し、Opn5 グループが、脊椎動物の進化過程で視覚オプシンのグループと同様に広範に多様化し、これまでメカニズムが謎であった非視覚機能に關与していること、また、これまでのオプシンの常識を覆す分子特性を示すオプシンが含まれることを発見した。

2. 研究の目的

研究代表者は、多様な分子特性を示す Opn5 グループの多様化の分子メカニズムを解析し、また、それらが關与する生理機能を、遺伝子改変動物の解析を含めた種々の研究手法を用いて探索する。さらに、Opn5 グループと、研究が進んでいる脊椎動物の視覚オプシングループとの分子特性の比較解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) Opn5 グループの種々のオプシンについて、これまでに蓄積された様々なノウハウを活かして方法を最適化し、培養細胞系でリコンビナント体を作製した。また、それらの変異体も同様の方法で作製した。そして、それらの分子特性を生化学的・分光学的手法を用いて検討した。

(2) Opn5 のそれぞれのサブグループの遺伝子について、mRNA やタンパク質の局在を、in situ hybridization、および、免疫組織化学的手法を用いて検討した。また、關連する他の遺伝子についても同様に発現部位を解析し、Opn5 の発現パターンと比較した。

(3) Opn5 遺伝子をノックアウトしたモデル動物の作製を試み、Opn5 の生理機能の解析を試みた

(4) 視覚オプシングループのオプシンについて、リコンビナント体を作製し、Opn5 グループのオプシンとの分子特性の違いを生化学的・分光学的手法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) Opn5L1 及び Opn5L2 サブグループ

脊椎動物の Opn5 のうち、哺乳類が持たないものに Opn5L1 サブグループと Opn5L2 サブグループがある。Opn5L2 サブグループは後述する Opn5m サブグループと同様に Bistable 性を示す紫外光受容体であり、Opn5m サブグループと少し異なるが同様の組織局在を示す。一方、Opn5L1 は暗中で all-trans-retinal と結合して活性状態を形成し、光受容で不活性化するため、reverse photoreceptor として機能することが考えられる。そこで本研究では Opn5L1 についての機能解析を重点的に行った。

Opn5L1 の特異な分子特性を支える分子内メカニズムを解析するために、Opn5L1 を培養細胞系で大量に作製して共鳴ラマン散乱法で解析した。その結果、最も重要な分子内アダクトを形成した中間体におけるレチナール構造の詳細を明らかにすることに成功した。また、Opn5L1 は光によって不活性化された後自然に元の状態に戻るため、光サイクルにより活性が制御される。多様な動物の Opn5L1 の比較解析を行ったところ、不活性化される過程及び

そこから元の状態に回復する過程、それぞれにおいて時定数が大きく異なるものを見いだすことに成功した。

Opn5L1 の生理機能を探索するために、遺伝子を複数持つメダカで発現部位を確認したところ、脳内のいくつかの領域に発現が確認できた。次に、メダカのダブルロックアウトシステムを作製したところ、回転する縞模様への追従遊泳行動 (optomotor response) に影響がでることがわかった。さらに、シングルロックアウトシステムを作製して解析した結果、視覚依存的な遊泳行動の異常は2つのうちの一方の遺伝子のロックアウトに起因することがわかった。つまり、Opn5L1 は魚類の系統で遺伝子重複したと考えられるが、それが関わる生理機能に違いがあることがわかった。

Opn5L1 の生理機能をさらに探索するために、小型魚類 (メダカ) だけでなく鳥類 (ニワトリ) を用いて解析を行った。その結果、ニワトリの脳内のいくつかの領域に Opn5L1 陽性細胞を見いだすことができた。そして、その中でも視床下部における Opn5L1 陽性細胞は、生殖機能と関わりと報告のあるいくつかの遺伝子の発現と関連することがわかった。この結果は、ニワトリにおいて Opn5L1 は生殖活動を制御する可能性を示唆している。

(2) Opn5n サブグループ

Opn5n は可視光感受性の光受容体であり、哺乳類以外の脊椎動物で網膜の視細胞に発現する。Opn5n 遺伝子を複数持つメダカを用いてダブルロックアウトシステムを作製したところ、視細胞の明暗での形態変化に影響がでることがわかった。さらに、シングルロックアウトシステムを作製して解析したところ、ダブルロックアウトで観察された明暗での形態変化の異常は、2つの遺伝子のどちらをロックアウトしても観察されることがわかった。Opn5n 遺伝子は Opn5L1 遺伝子と同様に魚類の系統で遺伝子重複したと考えられるが、それらの遺伝子は重複して同じ生理機能に関わる可能性が示唆された。

(3) Opn5m サブグループ

Opn5m は紫外光感受性の光受容体であり、研究代表者らはマウスおよびマーモセットを用いて視床下部に発現することを見いだしている。そこで、ヒトの視床下部での発現を確認するため、Opn5m の N 末・C 末領域をエピトープとして数種類の特異的抗体を作製した。そして、フィンランドの研究者とヒトの組織の提供に関わる MTA を交わし、実験を行う準備を進めている。また、Opn5m は Bistable 性の分子特性を示すが、変異を導入することにより、Opn5m を reverse photoreceptor である Opn5L1 の分子特性を示すように改変することができた。すなわち、4つのサブグループに分岐する Opn5 グループの多様化に関わる残基を特定することに成功した。

(4) 他のオプシン類の解析

Opn5 グループは脊椎動物の系統で4つのサブグループに多様化しており、N 端から 188 番目の残基の変化がこの多様化の基礎になっている。この残基の変化では、G タンパク質活性化効率の大きな変化はみられないことがわかった。一方、脊椎動物の視覚オプシンへの多様化には 113 番目の残基の変化が重要であり、その結果として G タンパク質活性化効率の大きな上昇がみられる。脊椎動物に最も近縁の無脊椎動物であるホヤのオプシンを解析したところ、このオプシンでは 113 番目の残基の変化が起こっているが、機能は不完全であり、進化的に中間状態にある分子特性を示すことがわかった。

Opn5m や Opn5L2 は脊椎動物の脳内で機能する紫外光受容体である。オプシンの分子系統関係において離れた位置にあるショウジョウバエの Rh7 を解析したところ、同じように脳内で機能する紫外光受容体であった。さらに Opn5m、Opn5L2、Rh7 はいずれも、紫外光を中心に青色光まで幅広い光波長を受容できる特異な光センサーであり、これは視覚ではなく脳内での光受容に特化した分子特性である可能性が考えられた。

脊椎動物のオプシンでは、Opn5 グループと並んで視物質を含むグループが大きく多様化していることがわかっている。そこで、視物質を含むオプシングループの多様化過程について並行して解析を行った。その結果、従来脳内でのみ機能すると考えられていた視物質に近縁なオプシン (ピノプシン) がいくつかの動物では視物質として機能しうることを見いだした。その結果から、脊椎動物の視物質の多様化と視覚機能の進化的獲得の従来モデ

ルを修正することに成功した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

Yue WWS, Silverman D, Ren X, Frederiksen R, Sakai K, Yamashita T, Shichida Y, Cornwall MC, Chen J, Yau KW. Elementary response triggered by transducin in retinal rods. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有 2019 116(11):5144-5153. doi: 10.1073/pnas.1817781116.

Sato K, Yamashita T, Kojima K, Sakai K, Matsutani Y, Yanagawa M, Yamano Y, Wada A, Iwabe N, Ohuchi H, Shichida Y. Pinopsin evolved as the ancestral dim-light visual opsin in vertebrates. *Commun Biol*. 査読有 2018 1:156. doi: 10.1038/s42003-018-0164-x.

Yanagawa M, Hiroshima M, Togashi Y, Abe M, Yamashita T, Shichida Y, Murata M, Ueda M, Sako Y. Single-molecule diffusion-based estimation of ligand effects on G protein-coupled receptors. *Sci Signal*. 査読有 2018 11(548). pii: eaao1917. doi:10.1126/scisignal.aao1917.

Shen YC, Sasaki T, Matsuyama T, Yamashita T, Shichida Y, Okitsu T, Yamano Y, Wada A, Ishizuka T, Yawo H, Imamoto Y. Red-Tuning of the Channelrhodopsin Spectrum Using Long Conjugated Retinal Analogues. *Biochemistry*. 査読有 2018 57(38):5544-5556. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00583.

Katagiri S, Iwasa M, Hayashi T, Hosono K, Yamashita T, Kuniyoshi K, Ueno S, Kondo M, Ueyama H, Ogita H, Shichida Y, Inagaki H, Kurahashi H, Kondo H, Ohji M, Hotta Y, Nakano T. Genotype determination of the OPN1LW/OPN1MW genes: novel disease-causing mechanisms in Japanese patients with blue cone monochromacy. *Sci Rep*. 査読有 2018 8(1):11507. doi: 10.1038/s41598-018-29891-9.

Maeda R, Hiroshima M, Yamashita T, Wada A, Sako Y, Shichida Y, Imamoto Y. Shift in Conformational Equilibrium Induces Constitutive Activity of G-Protein-Coupled Receptor, Rhodopsin. *J Phys Chem B*. 査読有 2018 122(18):4838-4843. doi: 10.1021/acs.jpcc.8b02819.

Sato K, Yamashita T, Ohuchi H, Takeuchi A, Gotoh H, Ono K, Mizuno M, Mizutani Y, Tomonari S, Sakai K, Imamoto Y, Wada A, Shichida Y. Opn5L1 is a retinal receptor that behaves as a reverse and self-regenerating photoreceptor. *Nat Commun*. 査読有 2018 9(1):1255. doi: 10.1038/s41467-018-03603-3.

Yoshida K, Yamashita T, Sasaki K, Inoue K, Shichida Y, Kandori H. Chimeric microbial rhodopsins for optical activation of Gs-proteins. *Biophys Physicobiol*. 査読有 2017 14:183-190. doi: 10.2142/biophysico.14.0_183.

Sakai K, Tsutsui K, Yamashita T, Iwabe N, Takahashi K, Wada A, Shichida Y. *Drosophila melanogaster* rhodopsin Rh7 is a UV-to-visible light sensor with an extraordinarily broad absorption spectrum. *Sci Rep*. 査読有 2017 7(1):7349. doi: 10.1038/s41598-017-07461-9.

Kojima K, Yamashita T, Imamoto Y, Kusakabe TG, Tsuda M, Shichida Y. Evolutionary steps involving counterion displacement in a tunicate opsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有 2017 114(23):6028-6033. doi: 10.1073/pnas.1701088114.

Kojima K, Matsutani Y, Yamashita T, Yanagawa M, Imamoto Y, Yamano Y, Wada A, Hisatomi O, Nishikawa K, Sakurai K, Shichida Y. Adaptation of cone pigments found in green rods for scotopic vision through a single amino acid mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有 2017 114(21):5437-5442. doi: 10.1073/pnas.1620010114.

Okitsu T, Matsuyama T, Yamashita T, Ishizuka T, Yawo H, Imamoto Y, Shichida Y, Wada A. Alternative Formation of Red-Shifted Channelrhodopsins: Noncovalent Incorporation with Retinal-Based Enamine-Type Schiff Bases and Mutated

Channelopsin. Chem Pharm Bull (Tokyo). 査読有 2017 65(4):356-358. doi: 10.1248/cpb.c17-00054.

Yue WW, Frederiksen R, Ren X, Luo DG, Yamashita T, Shichida Y, Cornwall MC, Yau KW. Spontaneous activation of visual pigments in relation to openness/closedness of chromophore-binding pocket. Elife. 査読有 2017 6. pii: e18492. doi: 10.7554/eLife.18492.

Kato M, Sugiyama T, Sakai K, Yamashita T, Fujita H, Sato K, Tomonari S, Shichida Y, Ohuchi H. Two Opsin 3-Related Proteins in the Chicken Retina and Brain: A TMT-Type Opsin 3 Is a Blue-Light Sensor in Retinal Horizontal Cells, Hypothalamus, and Cerebellum. PLoS One. 査読有 2016 11(11):e0163925. doi: 10.1371/journal.pone.0163925.

Sato K, Yamashita T, Haruki Y, Ohuchi H, Kinoshita M, Shichida Y. Two UV-Sensitive Photoreceptor Proteins, Opn5m and Opn5m2 in Ray-Finned Fish with Distinct Molecular Properties and Broad Distribution in the Retina and Brain. PLoS One. 査読有 2016 11(5):e0155339. doi: 10.1371/journal.pone.0155339.

〔学会発表〕(計 20 件)

佐藤恵太、山下高廣、小島慧一、松谷優樹、酒井佳寿美、柳川正隆、山野由美子、和田昭盛、岩部直之、大内淑代、七田芳則「ピノプシンは薄明視を担う視物質として進化してきた光受容タンパク質である」日本分子生物学会第 41 回年会 (2018)

Shichida Y「Historical review in the field of visual pigments and related retinal proteins」18th International Conference on Retinal Proteins (2018)

Yamashita T, Sato K, Kojima K, Sakai K, Matsutani Y, Yanagawa M, Yamano Y, Wada A, Iwabe N, Ohuchi H, Shichida Y「Pinopsin acts as a scotopic visual pigment in lower vertebrates」18th International Conference on Retinal Proteins (2018)

佐藤恵太、山下高廣、大内淑代、竹内敦子、後藤人志、小野勝彦、水野操、水谷泰久、友成さゆり、酒井佳寿美、今元泰、七田芳則「脊椎動物の光受容体 Opn5L1 は逆行性・自己再生能を持つ新しいタイプのオプシンである」日本生物物理学会第 56 回年会 (2018)

山下高廣「脊椎動物の暗所視獲得プロセスを再考する」日本生物物理学会第 56 回年会 (2018)

野口直人、山下高廣、七田芳則、今元泰「フーリエ変換赤外分光法によるロドプシンと錐体視物質の発色団/蛋白質相互作用の比較」日本生物物理学会第 56 回年会 (2018)

酒井佳寿美、筒井圭、山下高廣、岩部直之、高橋慶祐、和田昭盛、七田芳則「ショウジョウバエロドプシン Rh7 のスペクトル特性」日本動物学会第 89 回大会 (2018)

山下高廣「光で活性化されず不活性化される非視覚光受容タンパク質 Opn5L1」日本動物学会第 89 回大会 (2018)

七田芳則「レチノイドタンパク質の機能最適化と分子進化」日本レチノイド研究会第 28 回学術集会 (2017)

Shichida Y「Function and molecular evolution of visual pigments」8th Asia and Oceania Conference on Photobiology (2017)

佐藤恵太、山下高廣、小島慧一、松谷優樹、酒井佳寿美、柳川正隆、山野由美子、和田昭盛、岩部直之、大内淑代、七田芳則「魚類および両生類のピノプシン」日本動物学会第 88 回大会 (2017)

山下高廣、佐藤恵太、小島慧一、松谷優樹、酒井佳寿美、柳川正隆、山野由美子、和田昭盛、岩部直之、大内淑代、七田芳則「脊椎動物の視物質とピノプシンの熱活性化効率の比較解析」日本生物物理学会第 55 回年会 (2017)

酒井佳寿美、筒井圭、山下高廣、岩部直之、高橋慶祐、和田昭盛、七田芳則「ショウジョウバエ Rh7 の特徴的な幅広い吸収スペクトルの解析」日本生物物理学会第 55 回年会 (2017)

小島慧一、松谷優樹、柳川正隆、山下高廣、今元泰、久富修、山野由美子、和田昭盛、七田芳則「暗所視を司る錐体視物質の低い熱雑音の進化的獲得」日本生物物理学会

第 55 回年会 (2017)

西尾幸実、山下高廣、佐藤恵太、今元泰、大内淑代、七田芳則「脊椎動物の光受容タンパク質 Opn5 の分子特性の多様化とその変換」 日本生物物理学会第 55 回年会 (2017)

Shichida Y「Thermal Isomerization of Chromophore in visual pigment」 17th Congress of the European Society for Photobiology (2017)

山下高廣、沢田幾太郎、佐藤恵太、坂本尚昭、高橋慶祐、岩部直之、大内淑代、山本卓、七田芳則「新口動物の光受容タンパク質 Opn5 の多様性」 日本生物物理学会第 54 回年会 (2016)

Kojima K, Yanagawa M, Matsutani Y, Yamashita T, Imamoto Y, Yamano Y, Wada A, Shichida Y「Comparative analysis of thermal activation rate in vertebrate cone visual pigments」 日本動物学会第 87 回大会 (2016)

Yamashita T「Characterization of visible light-sensitive subtype of non-visual opsin, Opn5」 17th International Conference on Retinal Proteins (2016)

Shichida Y「Molecular Properties on Opn5L1, one of the subgroups of Opn5」 17th International Conference on Retinal Proteins (2016)

〔その他〕

ホームページ等

http://photo1.biophys.kyoto-u.ac.jp/mp/home_jp.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

今元 泰 (IMAMOTO, Yasushi)

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80263200

山下 高廣 (YAMASHITA, Takahiro)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：50378535