

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07437

研究課題名(和文) 視細胞における未知の情報変換システムの解析

研究課題名(英文) Analysis of uncharacterized phototransduction system in the vertebrate photoreceptor cells

研究代表者

山下 高廣 (Yamashita, Takahiro)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：50378535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Opn5は脊椎動物に広く見いだされる光受容タンパク質オプシンである。そして、脊椎動物のOpn5は4つのサブグループに分類でき、分子特性や生体内での発現部位が多様化していることを見いだし、本研究では、そのうち可視光受容で視細胞に発現するOpn5nの解析を行った。メダカを用いてノックアウトシステムを作製し生理機能解析を行ったところ、網膜における暗順応・明順応に対応した形態変化に問題が生じることがわかった。また、分子特性の詳細な解析を行った結果、可視光受容のために重要なアミノ酸残基の同定とOpn5グループ内でのその残基の変遷を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物は外界の光環境の変化から多様な情報を手に入れている。そのために重要な光センサーがオプシン類である。動物のゲノムでオプシン遺伝子を探索すると、哺乳類は10以下と少ないが、他の脊椎動物ではその倍以上持つものが多い。つまり、哺乳類以外の脊椎動物はより多様なオプシンを用いて、光環境の変化から多彩な情報を手に入れていると考えられる。本研究では、そのようなことに関わる1つのオプシン遺伝子を解析し、哺乳類では見られない光応答システムを明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：Opn5 forms one of the photoreceptive protein, opsin, groups, whose genes are widely distributed in vertebrate genomes. We previously revealed that vertebrate Opn5 is classified into several subgroups and is diversified based on their molecular properties and tissue distribution patterns. In this study, we analyzed one of the subgroups, Opn5n, which is sensitive to visible light and is expressed in the photoreceptor cells. We constructed knock-out medaka fish line and revealed that the fish shows deficient morphological changes in dark-adapted and light-adapted retinas. In addition, we characterized the key amino acid residue(s) responsible for the visible light sensitivity in Opn5n.

研究分野：分子生理学

キーワード：光受容蛋白質 視細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

動物はものの形や色を認識するだけでなく、時刻や季節の認識など多様な情報を外界の光環境の変化から得ている。このような視覚・非視覚の光受容に関わる光受容タンパク質がロドプシンに代表されるオプシン類である。このオプシン類は、そのアミノ酸配列からいくつかのグループに分類できる。中でもオプシン5 (Opn5) はヒト・マウスのゲノムから単離され、網膜や脳における発現が報告されたものの、その詳細な局在や分子特性、生理機能の解析が遅れていた。また、他の脊椎動物のゲノム上で Opn5 グループの遺伝子を探索すると、ほとんどの哺乳類は1遺伝子 (Opn5m) しか持たないが、哺乳類以外の脊椎動物は複数の Opn5 遺伝子を持ち、これら脊椎動物の Opn5 遺伝子は4つのサブグループ (Opn5m, L1, L2, n) に分類できることがわかる。そしてこれまで、これらの分子特性や生体内での発現部位を比較解析することを進めてきた。分子特性を解析した結果、吸収する光波長 (紫外光感受性や可視光感受性) や結合するレチナル異性体の種類などによって多様化していることがわかった。また、生体内での発現部位を解析した結果、網膜や脳内においてそれぞれ特徴的な発現パターンが見られた。Opn5 の関わる生理機能については、近年、他のグループからも報告が相次いでいる。しかし、それらは専らマウスやカエルにおける Opn5m の生理機能の解析であり、他の Opn5 サブグループの機能解析の報告はない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、Opn5m 以外のサブグループの中で、特に特徴的な分子特性や生体内発現部位を示す Opn5n の解析を進めることを目的とした。この Opn5n は可視光感受性で、哺乳類以外の脊椎動物の網膜の視細胞に発現することがわかっている。そこで、視細胞に存在する視物質以外のオプシンが駆動する光受容変換システムの生理機能に迫る。さらには、Opn5 グループにおける分子特性の多様化プロセスを明らかにし、他のオプシングループと比較解析する。

## 3. 研究の方法

オプシン類の分子特性については、培養細胞でリコンビナント体を最適化された条件により作製し、独自に開発した分光学的・生化学的手法等により解析を行った。オプシン類の生体内での発現部位については、免疫染色法、または *in situ hybridization* 法を用いて解析した。メダカを用いた生理機能の解析については、ノックアウトメダカを用いて、組織学的・行動学的解析を行った。

## 4. 研究成果

### Opn5n の機能解析

メダカを用いて Opn5n の生理機能解析を行うため、ノックアウト系統を作製した。そして、網膜の形態を調べたところ、暗順応条件と明順応条件で形態が変化する (視細胞と網膜色素上皮との位置関係が変化する) 網膜運動現象に異常をきたしていることがわかった。

### 他の Opn5 サブグループの機能解析

メダカの行動解析を行うために、メダカの周りで縞模様を回転させた時に自由遊泳のメダカが回転に追従して泳ぐ *optomotor response* (OMR) を1時間以上継続して観察できる系を確立した。そして、実際にメダカの観察を行ったところ、Opn5n とは別の Opn5 サブタイプのノックアウト個体において、OMR に異常がでることがわかった。

### Opn5 グループの分子特性解析

脊椎動物の Opn5 は、その祖先型は紫外光感受性であり、その後の多様化の過程で可視光感受性の Opn5n ができたと考えている。この分子進化プロセスを検証するため、Opn5 の変異体を解析した結果、可視光受容のために重要なアミノ酸残基の同定とその変遷を明らかにすることができた。また、脊椎動物の Opn5 の中には、分子特性が他のオプシンと大きく異なり、光サイクルで活性が制御されるものが存在する。この光サイクルを形成する分子内の詳細なメカニズムを明らかにすることに成功した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計15件)

1. W.W.S. Yue, D. Silverman, X. Ren, R. Frederiksen, K. Sakai, T. Yamashita, Y. Shichida, M.C. Cornwall, J. Chen, K.W. Yau (2019) Elementary response triggered by transducin

- in retinal rods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 5144-53. doi: 10.1073/pnas.1817781116.
2. K. Sato, T. Yamashita, K. Kojima, K. Sakai, Y. Matsutani, M. Yanagawa, Y. Yamano, A. Wada, N. Iwabe, H. Ohuchi and Y. Shichida (2018) Pinopsin evolved as the ancestral dim-light visual opsin in vertebrates. *Commun. Biol.* 1, 156. doi: 10.1038/s42003-018-0164-x.
  3. M. Yanagawa, M. Hiroshima, Y. Togashi, M. Abe, T. Yamashita, Y. Shichida, M. Murata, M. Ueda and Y. Sako (2018) Single-molecule tracking of GPCR diffusion within the plasma membrane reveals the type of ligand with which it interacts. *Sci. Signal.* 11, eaao1917. doi: 10.1126/scisignal.aao1917.
  4. Y.C. Shen, T. Sasaki, T. Matsuyama, T. Yamashita, Y. Shichida, T. Okitsu, Y. Yamano, A. Wada, T. Ishizuka, H. Yawo and Y. Imamoto (2018) Red-tuning of channelrhodopsin spectrum using long-conjugated retinal analogues. *Biochemistry* 57, 5544-56. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00583.
  5. S. Katagiri, M. Iwasa, T. Hayashi, K. Hosono, T. Yamashita, K. Kuniyoshi, S. Ueno, M. Kondo, H. Ueyama, H. Ogita, Y. Shichida, H. Inagaki, H. Kurahashi, H. Kondo, M. Ohji, Y. Hotta and T. Nakano (2018) Genotype determination of the OPN1LW/OPN1MW genes: novel disease-causing mechanisms in Japanese patients with blue cone monochromacy. *Sci. Rep.* 8, 11507. doi: 10.1038/s41598-018-29891-9.
  6. R. Maeda, M. Hiroshima, T. Yamashita, A. Wada, Y. Sako, Y. Shichida and Y. Imamoto (2018) Shift in conformational equilibrium induces constitutive activity of G-protein-coupled receptor, rhodopsin. *J. Phys. Chem. B.* 122, 4838-43. doi: 10.1021/acs.jpcc.8b02819.
  7. K. Sato, T. Yamashita, H. Ohuchi, A. Takeuchi, H. Gotoh, K. Ono, M. Mizuno, Y. Mizutani, S. Tomonari, K. Sakai, Y. Imamoto, A. Wada and Y. Shichida (2018) Opn5L1 is a retinal receptor that behaves as a reverse and self-regenerating photoreceptor. *Nat. Commun.* 9, 1255. doi: 10.1038/s41467-018-03603-3.
  8. K. Yoshida, T. Yamashita, K. Sasaki, K. Inoue, Y. Shichida and H. Kandori (2017) Chimeric microbial rhodopsins for optical activation of Gs-proteins. *Biophys. Physicobiol.* 14, 183-90. doi: 10.2142/biophysico.14.0\_183.
  9. K. Sakai, K. Tsutsui, T. Yamashita, N. Iwabe, K. Takahashi, A. Wada and Y. Shichida (2017) *Drosophila melanogaster* rhodopsin Rh7 is a UV-to-visible light sensor with an extraordinarily broad absorption spectrum. *Sci. Rep.* 7, 7349. doi: 10.1038/s41598-017-07461-9.
  10. K. Kojima, T. Yamashita, Y. Imamoto, T.G. Kusakabe, M. Tsuda and Y. Shichida (2017) Evolutionary steps involving counterion displacement in a tunicate opsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114 6028-33. doi: 10.1073/pnas.1701088114.
  11. K. Kojima, Y. Matsutani, T. Yamashita, M. Yanagawa, Y. Imamoto, Y. Yamano, A. Wada, O. Hisatomi, K. Nishikawa, K. Sakurai and Y. Shichida (2017) Adaptation of cone pigments found in green rods for scotopic vision through a single amino acid mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114 5437-42. doi: 10.1073/pnas.1620010114.
  12. T. Okitsu, T. Matsuyama, T. Yamashita, T. Ishizuka, H. Yawo, Y. Imamoto, Y. Shichida and A. Wada (2017) Alternative formation of red-shifted channelrhodopsins: Non-covalent incorporation with retinal-based enamine-type Schiff bases and mutated channelopsin. *Chem. Pharm. Bull.* 65, 356-8. doi: 10.1248/cpb.c17-00054.
  13. W.W.S. Yue, R. Frederiksen, X. Ren, D.G. Luo, T. Yamashita, Y. Shichida, M.C. Cornwall and K.W. Yau (2016) Spontaneous activation of visual pigments in relation to openness of chromophore-binding pocket. *eLife* 6, e18492. doi: 10.7554/eLife.18492.
  14. M. Kato, T. Sugiyama, K. Sakai, T. Yamashita, H. Fujita, K. Sato, S. Tomonari, Y. Shichida and H. Ohuchi (2016) Two opsin 3-related proteins in the chicken retina and brain: A TMT-type opsin 3 is a blue light sensor of the retinal horizontal cells, hypothalamus, and cerebellum. *PLoS One* 11, e0163925. doi: 10.1371/journal.pone.0163925.
  15. K. Sato, T. Yamashita, Y. Haruki, H. Ohuchi, M. Kinoshita and Y. Shichida (2016) Two UV-Sensitive Photoreceptor Proteins, Opn5m and Opn5m2 in Ray-Finned Fish with

〔学会発表〕

招待講演（計4件）

1. 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（2018,16th,Sep., 岡山大/岡山県）
2. 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回大会札幌（2018,13th,Sep., 札幌コンベンションセンター/北海道）
3. T. Yamashita「Blue light-sensitive subtype of vertebrate non-visual opsin Opn5」International Symposium on Biophysics of Rhodopsins（2017,12th,May, 京都大/京都府）
4. T. Yamashita「Characterization of visible light-sensitive subtype of non-visual opsin, Opn5」17th International Conference on Retinal Proteins（2016,5th,Oct., Potsdam/Germany）

その他学会発表（計22件）

1. 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「ピノブ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（2018,28th,Nov., パシフィコ横浜/神奈川県）
2. T. Yamashita, K. Sato, K. Kojima, K. Sakai, Y. Matsutani, M. Yanagawa, Y. Yamano, A. Wada, N. Iwabe, H. Ohuchi, Y. Shichida「Pinopsin acts as a scotopic visual pigment in lower vertebrates」18th International Conference on Retinal Proteins（2018,25th,Sep., Toronto/Canada）
3. M. Mizuno, Y. Mizutani, K. Sato, H. Ohuchi, T. Yamashita, K. Sakai, Y. Imamoto, Y. Shichida, Y. Yamano, A. Wada「Chromophore structure in an inactive state of a novel photosensor Opn5L1 of vertebrates」18th International Conference on Retinal Proteins（2018,25th,Sep., Toronto/Canada）
4. Y.C. Shen, T. Sasaki, T. Matsuyama, T. Yamashita, Y. Shichida, T. Okitsu, Y. Yamano, A. Wada, T. Ishizuka, H. Yawo, Y. Imamoto「Development of Red-Shifted Channelrhodopsin Variants Using Long-Conjugated Retinal Analogues」18th International Conference on Retinal Proteins（2018,25th,Sep., Toronto/Canada）
5. K. Sakai, K. Tsutsui, T. Yamashita, N. Iwabe, K. Takahashi, A. Wada, Y. Shichida「Drosophila melanogaster Rh7 is a UV-to-visible light sensor having extraordinarily broad absorption spectrum」18th International Conference on Retinal Proteins（2018,25th,Sep., Toronto/Canada）
6. K. Sato, Y. Nishio, T. Yamashita, Y. Imamoto, H. Ohuchi, Y. Shichida「Functional conversion of molecular property of Opn5 by key amino acid substitution」18th International Conference on Retinal Proteins（2018,27th,Sep., Toronto/Canada）
7. 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「脊椎動物の非受容体 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（2018,15th,Sep., 岡山大/岡山県）
8. 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/タンパク質相互作用の比較」日本生物物理学会第56回年会（2018,17th,Sep., 岡山大/岡山県）
9. 沈宜中、佐々木寿算、松山武オジヨス、山下高廣、七田芳則、沖津貴志、山野由美子、和田昭盛、石塚徹、八尾寛、今元泰「Development of Red-Shifted Channelrhodopsin Variants Using Long-Conjugated Retinal Analogues」日本生物物理学会第56回年会（2018,17th,Sep., 岡山大/岡山県）
10. 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「シヨ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回大会札幌（2018,15th,Sep., 札幌コンベンションセンター/北海道）
11. 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 (2017,23rd,Sep., 富山大/富山県)
12. 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 (2017,19th,Sep., 熊本大/熊本県)
  13. 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 (2017,19th,Sep., 熊本大/熊本県)
  14. 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 (2017,19th,Sep., 熊本大/熊本県)
  15. 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 (2017,19th,Sep., 熊本大/熊本県)
  16. 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 (2016,25th,Nov., つくば国際会議場/茨城県)
  17. 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「桿体視細胞に発現する視物質の熱活性化頻度」日本生物物理学会第 54 回年会 (2016,25th,Nov., つくば国際会議場/茨城県)
  18. 今元泰、小島慧一、岡俊彦、山下高廣、七田芳則「桿体アレスチンのサプライズバリエーション・p44 の自己会合の解析」日本生物物理学会第 54 回年会 (2016,25th,Nov., つくば国際会議場/茨城県)
  19. K. Kojima, M. Yanagawa, Y. Matsutani, T. Yamashita, Y. Imamoto, Y. Yamano, A. Wada, Y. Shichida 「Comparative analysis of thermal activation rate in vertebrate cone visual pigments」日本動物学会第 87 回大会 (2016,17th,Nov., 沖縄コンベンションセンター/沖縄県)
  20. Y. Matsutani, K. Kojima, M. Yanagawa, T. Yamashita, Y. Imamoto, O. Hisatomi, Y. Yamano, A. Wada, Y. Shichida 「Optimization mechanism of vertebrate visual pigments for photic environment」日本動物学会第 87 回大会 (2016,17th,Nov., 沖縄コンベンションセンター/沖縄県)
  21. T. Yamashita, I. Sawada, K. Sato, N. Sakamoto, N. Takahashi, N. Iwabe, H. Ohuchi, T. Yamamoto, Y. Shichida 「Analysis of the photoreceptor protein Opn5 found in deuterostomes other than vertebrates」日本動物学会第 87 回大会 (2016,17th,Nov., 沖縄コンベンションセンター/沖縄県)
  22. R. Mabuchi, K. Sato, T. Yamashita, H. Ohuchi, H. Gotoh, K. Ono, S. Tomonari, S. Ansai, M. Kinoshita, Y. Shichida 「Functional analysis of non-visual photoreceptor protein Opn5L1 found in medaka」日本動物学会第 87 回大会 (2016,17th,Nov., 沖縄コンベンションセンター/沖縄県)

〔図書〕(計 2 件)

1. 山下高廣 (2018) 「G タンパク質」の項 「動物学の百科事典」(分担執筆)(丸善出版)
2. 山下高廣 (2016) 「G タンパク質」の項 「光と生命の辞典」(分担執筆)(朝倉書店)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

Web メディア「academist Journal」研究紹介コラム

山下高廣、佐藤恵太、七田芳則：視覚進化の新モデル—哺乳類が失った“ピノプシン”からたどる脊椎動物の暗所視と色覚 2018 年 11 月 16 日掲載

ホームページ等

[http://photo1.biophys.kyoto-u.ac.jp/mp/home\\_jp.html](http://photo1.biophys.kyoto-u.ac.jp/mp/home_jp.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。