

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657023

研究課題名（和文） 脳内メラノプシンによる行動制御

研究課題名（英文） Control of behavior and locomotion by brain melanopsin

研究代表者

日下部 岳広 (KUSAKABE TAKEHIRO)

甲南大学・理工学部・教授

研究者番号：40280862

研究成果の概要（和文）：

ホヤ幼生は眼点で光を感じて遊泳行動を制御することが知られている。ところが、研究代表者らは発生遺伝学的な操作により眼点視細胞を完全に欠いたホヤ幼生が、光に応答した運動を示すことをみいだした。遺伝子ノックダウンなどにより、メラノプシンが視細胞欠損幼生の光応答を担う光受容体である可能性が高いことを示した。メダカを用いて本現象の普遍性を検証し、メラノプシン遺伝子が脳内の特定の神経細胞で発現することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Swimming behavior of the ascidian larva is controlled by photoreception of the ocellus. We have found that, however, the *otx* knockdown (morphant) larva, which completely lacks the ocellus, shows a photo response. By the analysis of expression sites and role of opsins other than the one expressed in the ocellus photoreceptor, we have identified melanopsin ortholog as a candidate opsin responsible for photo response in the *otx* morphant larva. We also found that a melanopsin gene is expressed in particular types of neurons in the brain of medaka *Oryzias latipes*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 動物行動・生理

キーワード：脳・神経、オペシン、眼外光受容、ホヤ、メダカ

## 1. 研究開始当初の背景

眼と松果体を取り除いた個体が光に対する生理反応を示し、脳の松果体以外の部位に

光受容細胞が存在することが、魚類や鳥類などで古くから知られている (von Friesch 1911; Benoit 1935; van Veen et al. 1976)。

光受容体タンパク質であるオプシン類が脳深部に存在することも、哺乳類を含め、脊椎動物で広く知られている。しかし、脳による光受容を担う分子の本体はいまだに明らかにされていない。最近、視床下部のVAオプシンが鳥類の光周性の光受容を担っている可能性が報告されたが (Halford et al. 2009)、生理的役割を証明するには至っていない。カエルの皮膚の色素細胞がもつオプシンとして同定されたメラノプシンは、哺乳類では網膜神経節細胞の一部で発現し、概日リズムを調節している (Hattar et al. 2003)。メラノプシンは、多くの脊椎動物において、脳にも存在することが報告されている (Bellingham et al. 2006) が、その生理機能はまったく不明である。

研究代表者は、転写因子 Otx の機能阻害を施したホヤ幼生 (*otx* モルファント) が眼点視細胞を完全に欠損することをみいだした。予想外なことに、*otx* モルファントは視物質オプシン Ci-opsin1 を発現しないにも関わらず、光刺激に明瞭な応答を示した。ホヤゲノムにコードされるオプシン遺伝子を網羅的に調べ、ホヤ・メラノプシン遺伝子 *Ci-opsin4* が *otx* モルファントで影響を受けない脳後部のニューロンで発現することを明らかにした。これらの新知見に基づいて、(i) 眼点とは異なる未知の光受容細胞がホヤ幼生の運動の制御に関与し、(ii) ホヤ・メラノプシンがこの光受容を担う、という作業仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

網膜神経節細胞の一部に存在し概日リズムの調節にはたらく光受容体タンパク質メラノプシンは、多くの脊椎動物において、脳にも存在していることが知られている。しかし、その生理機能はまったく不明である。研究代表者は、発生遺伝学的な操作により眼点視細胞を完全に欠いたホヤ幼生が、光に応答した運動を示すことをみいだした。この視細胞をもたない幼生の脳には、メラノプシン型のオプシン遺伝子が発現している。メラノプシンが視細胞欠損幼生の光応答を担っているという作業仮説に基づいて、この光応答の発現機構を解析する。本研究により、メラノプシンおよび脳内光感受性ニューロンの新しい役割が明らかになると期待される。さらに、ホヤで得られた知見をもとに脊椎動物における類似の生理機構も検証する。

## 3. 研究の方法

(1) ホヤ・メラノプシン及びその他の新奇オプシンを発現する神経細胞の同定

ホヤ神経系の特定の細胞の分子マーカーとホヤ・メラノプシンとの2重染色により、

ホヤ・メラノプシンを発現する細胞の種類や形態、シナプス標的を明らかにする。メラノプシンを発現する細胞の可視化には、*in situ* ハイブリダイゼーション、プロモーターを利用した標識 (GFP、Kaede など) を用いる。

(2) *otx* モルファント幼生の光刺激応答の解析とそれに関わる神経細胞の同定

*otx* をノックダウンしたホヤ幼生 (*otx* モルファント) は、眼点視細胞をもたない (図1) が、光刺激に対する反応を示す (図2)。光刺激に対する *otx* モルファントの光応答プロファイルを詳しく解析するとともに、作用スペクトルを調べ、ホヤ・メラノプシンや他のオプシン類の吸収スペクトルと比較する。また、光応答に伴う神経活動パターンを調べる。ダブル遺伝子ノックダウンにより特定のニューロンの分化を阻害した *otx* モルファント幼生を用いて、光応答に関わる細胞を同定する。

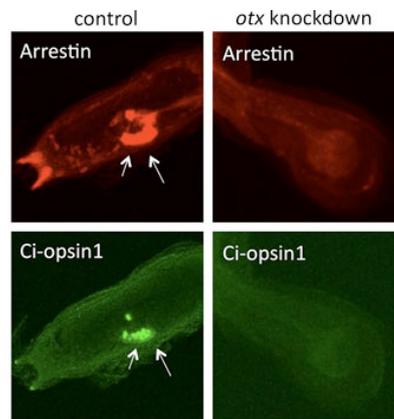


図1. *otx* モルファントにおける視細胞分化: *otx* 遺伝子をノックダウンした幼生 (右列) では視細胞特異的タンパク質 (アレスチンと視物質 Ci-opsin1) がみられない。

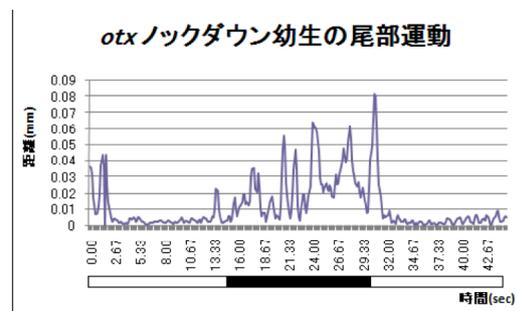


図2. *otx* モルファントの光刺激に対する応答: 暗刺激により激しい尾部の運動が誘起され、明刺激により運動性は速やかに消失する。

(3) ホヤ・メラノプシンおよび眼外で発現するオプシン類の機能解析

アンチセンス MO を用いたノックダウン実験や強制発現ベクターを用いた gain-of-function 実験により個体レベルの機能解析を行う。ホヤ・メラノプシン cDNA を適当な発現ベクターに組み込み、ほ乳類培養細胞に発現させて、ホヤ・メラノプシンの吸収スペクトルや細胞内シグナル伝達系を解析する。

(4) 脊椎動物においてメラノプシンが類似の新奇な役割をもつ可能性の検討

メダカを用い、ホヤでみいだしたものと類似の現象が脊椎動物でもみられるかどうかを検討する。上記のホヤ実験と同様の手法を用いるとともに、RT-PCR 法や in situ ハイブリダイゼーションなどにより発現部位を精査する。

#### 4. 研究成果

ホヤ幼生の眼点視細胞以外の細胞で発現するオプシン遺伝子を探索したところ、メラノプシンに加え、絨毛型オプシン Ci-opsin2 の遺伝子も特定の神経細胞で発現することが示唆された。それぞれのオプシンを発現する細胞の同定と両者の相互関係を明らかにするために、遺伝子の発現調節領域を単離し、蛍光レポーターに連結した融合遺伝子を組込んだプラスミドを構築した。

ホヤ・メラノプシン遺伝子 (*Ci-opsin4*) の発現調節領域を単離し、蛍光レポーターに連結した融合遺伝子を組込んだプラスミドを構築した。このプラスミドをホヤ胚に導入し、メラノプシンを発現する細胞を解析した。*Ci-opsin4* を発現する細胞は、脳胞後部と尾部後方の背側にみられ、いずれもその形態からニューロンと考えられた (図3)。

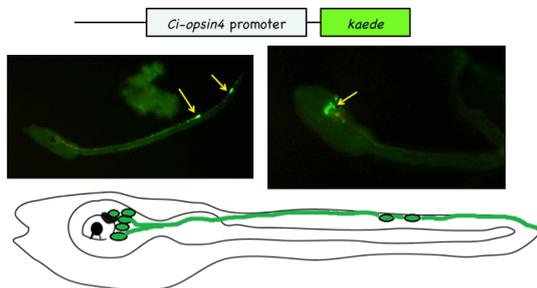


図3. 蛍光タンパク質 Kaede を用いたホヤ・メラノプシン発現細胞の可視化

*Ci-opsin4* を発現する細胞は、その位置から、いずれも *otx* モルファントに存在すると考えられた。*otx* モルファントの光応答に *Ci-opsin4* が関わる可能性を、遺伝子ノックダウン実験により検証した (図4)。

*Ci-opsin4* を単独でノックダウンしたホヤ幼生は、光には応答するが、再び暗条件に戻したときの急激な運動抑制がみられなくな

った。*otx* との二重ノックダウンを行ったところ、*otx* モルファントの光応答が消失した。以上の結果から、ホヤ・メラノプシンは *otx* モルファントの光応答を担う光受容体であることが示唆された。

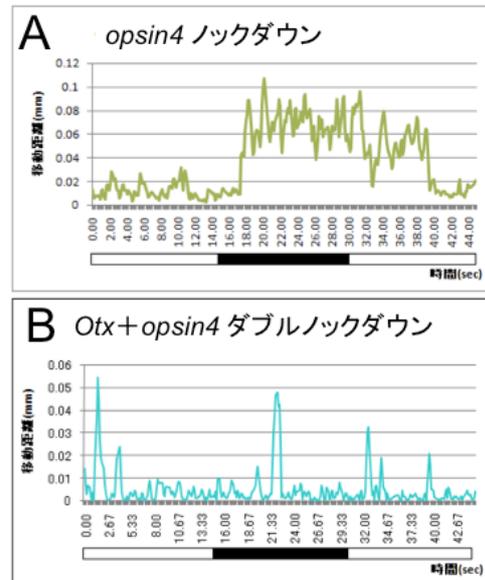


図4. (A) *Ci-opsin4* をノックダウンした幼生は光に応答したが、照射による急激な遊泳の抑制が観察されなかった。(B) 一方、*Ci-opsin4* と *otx* の両方をノックダウンした幼生では光応答がみられなかった。

*Ci-opsin2* については、プラスミドをホヤ胚に導入し、眼外オプシンを発現する細胞の種類や形態、シナプス標的を解析した。*Ci-opsin2* を発現する細胞は、付着突起、脳胞の一部と運動神経節の中央部にみられ、運動神経節の細胞は交叉性の軸索を神経索に沿って尾部中央まで伸ばしていた (図5)。付着突起の細胞は脳胞後部に軸索を伸ばす神経細胞であった。*Ci-opsin2* を発現する細胞のうち、運動神経節の細胞は *otx* モルファントに存在すると考えられ、メラノプシン細胞と並んで *otx* モルファントの光受容を担う可能性がある。

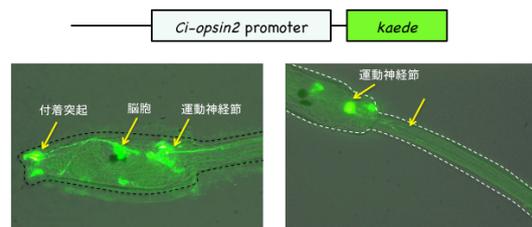


図5. *Ci-opsin2::kaede* の発現。付着突起の神経細胞とそこから脳胞後部へのびる軸索、脳胞の一部、運動神経節にあって、尾部へと軸索をのばす神経細胞が標識された。

また、新たに3つのオプシン遺伝子がホヤ幼生の眼点以外の部位で発現することを明らかにした。さらに、本現象の普遍性を検証するために、メダカのメラノプシン遺伝子を複数同定し、すくなくとも1つは脳の特定の部位で発現することを見出した。

脳内オプシンは脊椎動物で広く知られているが、その生理機能は大半が未解明である。ホヤと並んで脊椎動物の近縁動物であるナメクジウオ類にはメラノプシンをもつ視細胞がある。ナメクジウオ・メラノプシンは分子的性質が詳しく解明されているが、ナメクジウオでイン・ピボの分子機能を調べるのは困難である。本研究成果はユニークな実験系の特徴を生かして、普遍的な未解決問題にせまるものといえる。

また 本研究の成果は繊毛型 (ciliary) 視細胞と感桿型 (rhabdomeric) 視細胞の起源と進化という、進化生物学上の大きな問題の解明に重要な手がかりを与えるものである。近年、ナメクジウオの感桿型視細胞がメラノプシンをもち、その光化学・生化学的性質が前口動物の感桿型ロドプシンに類似であることが明らかにされた。しかしナメクジウオには脊椎動物型の視物質オプシンがない。両タイプのオプシンをもち、系統上、脊椎動物により近いとされるホヤをもちいた本研究の成果をもとに、今後、更に研究を発展させることで、脊椎動物のメラノプシン系の進化過程の解明につながると期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Koki Nishitsuji, Takeo Horie, Aoi Ichinose, Yasunori Sasakura, Hitoyoshi Yasuo, and Takehiro G. Kusakabe (2012) Cell lineage and *cis*-regulation for a unique GABAergic/glycinergic neuron type in the larval nerve cord of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Growth Differ.* **54** (2), 177-186. doi: 10.1111/j.1440-169X.2011.01319.x 査読有
- ② Florian Razy-Krajka, Euan Brown, Takeo Horie, Jacques Callebort, Yasunori Sasakura, Jean-Stéphane Joly, Takehiro Kusakabe, and Philippe Vernier (2012) Monoaminergic modulation of photoreception in ascidian: Evidence for a proto-hypothalamo-retinal territory. *BMC Biology* **10**, 15. doi: 10.1186/1741-7007-10-45 査読有
- ③ Takeo Horie, Ryoko Shinki, Yosuke Ogura, Takehiro G. Kusakabe, Nori Satoh, and Yasunori Sasakura (2011) Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells that form

the adult nervous system. *Nature* **469** (7331), 525-528. doi:10.1038/nature09631 査読有

- ④ Olivier Tassy, Delphine Dauga, Fabrice Daian, Daniel Sobral, François Robin, Pierre Khoueir, David Salgado, Vanessa Fox, Danièle Caillol, Renaud Schiappa, Baptiste Laporte, Anne Rios, Guillaume Luxardi, Takehiro Kusakabe, Jean-Stéphane Joly, Sébastien Darras, Lionel Christiaen, Magali Contensin, Héléne Auger, Clément Lamy, Clare Hudson, Ute Rothbacher, Michael J. Gilchrist, Kazuhiro W. Makabe, Kohji Hotta, Shigeki Fujiwara, Nori Satoh, Yutaka Satou, and Patrick Lemaire (2010) The ANISEED database: Digital representation, formalization, and elucidation of a chordate developmental program. *Genome Res.* **20** (10), 1459-1468. doi: 10.1101/gr.108175.110 査読有

[学会発表] (計10件)

- ① 目下部岳広: カタユウレイボヤ幼生の眼外光受容細胞. 日本動物学会第82回大会、2011年9月21日 旭川市大雪アリーナ
- ② 目下部岳広: 脊索動物に脊椎動物の起源を探る. 日本進化学会第13回大会(招待講演)、2011年7月31日 京都大学百年記念ホール
- ③ Takehiro G. Kusakabe: The tunicate nervous system: insights into the origin of vertebrate-specific traits. 第8回国際比較生理生化学会議(招待講演)、2011年6月5日 名古屋国際会議場
- ④ Takehiro G. Kusakabe: The origin and evolution of the cranial sensory organs and pituitary: evidence from basal chordates. 日本進化学会第12回東京大会・国際ワークショップ(招待講演)、2010年8月4日、東京工業大学大岡山キャンパス

[その他]

ホームページ等

- ① ホヤ遺伝子制御データベース (DBTGR) : <http://dbtgr.hgc.jp/>
- ② ホヤ統合データベース (Aniseed) : <http://crfb.univ-mrs.fr/aniseed/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

目下部 岳広 (KUSAKABE TAKEHIRO)

甲南大学・理工学部・教授

研究者番号 : 40280862