

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07144

研究課題名(和文) 個体の環境応答行動を制御する光センシング機構の解明

研究課題名(英文) Molecular and genetic analyses of light-sensing mechanisms regulating behavioral responses to ambient light conditions

研究代表者

小島 大輔 (KOJIMA, DAISUKE)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・講師

研究者番号：60376530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：動物は光環境への応答の一つとして、周囲の明暗や色に合わせて自身の体色を変化させる。真骨魚類ゼブラフィッシュを用いたこれまでの研究から、成魚型の体色変化(背地適応)の光制御には少なくとも2種類の光受容分子P416とP470が関与し、いずれも網膜に存在することがわかっていた。本研究では視細胞欠損個体を用いた実験を行い、P416は視細胞の光受容分子であること、またP470は視細胞以外の網膜ニューロンに存在することを明らかにした。さらに遺伝子ノックアウト実験の結果、非視覚型オプシンの一つ(メラノプシン)がP470として体色変化の光制御に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境刺激に反応して体の一部を変化させる「体色変化」は、一世紀以上前から多くの動物行動学者や生理学者の興味を惹き付けてきた研究課題であるが、体色変化の光制御の分子メカニズムはほとんど明らかになっていなかった。本研究で私たちは初めて、体色変化を制御する光受容分子の一つを同定することに成功した。今後この光受容分子の発現細胞を起点とした神経回路解析等を行うことにより、脳内のどの領域が光情報処理に関わっているのかなど、個体レベルでの体色変化の光制御メカニズムに迫ることができると期待される。

研究成果の概要(英文)：Many cold-blood vertebrates darken or lighten their body colors in response to ambient light intensities. Such a light-induced body color change, also called 'background adaptation', is mediated by photoreception in the retina. Our previous study on spectral sensitivity of body color change in larval zebrafish suggested that two kinds of spectrally distinct opsin-type molecules, tentatively termed P416 and P470, could mediate the photic regulation. In the current study, we demonstrated that P416 is present in rod and/or cone photoreceptor cells whereas P470 is located in non-rod non-cone retinal neurons. Genetic analyses of knock-out mutant larvae revealed that P470 is a melanopsin-type photoreceptive molecule present in a subtype of inner retinal neurons. The background adaptation of larval zebrafish is likely to be regulated by multiple types of photoreceptive molecules present in both 'classical' and 'non-classical' retinal photoreceptor cells.

研究分野：光生物学・感覚分子生理学

キーワード：光生物学 ゼブラフィッシュ 体色変化 網膜 オプシン 摂餌 視覚 転写因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

動物の体表は様々な色・模様(体色)を呈しているが、真骨魚類などの変温脊椎動物は様々な環境刺激、特に『光』に応答して体色を素早く変化させることが知られている。例えばヒラメやカメレオンは体色を背景そっくりに変化させること(背地適応: 図1)により、捕食者や被食者から自己をカモフラージュする。真骨魚類の背地適応を制御する光感受部位は眼球に存在することはほぼ一世紀前から知られていた [von Frisch 1911]。従来、眼球の光受容細胞は視細胞のみであると認識されていたため、視細胞が体色変化を光制御すると考えられてきた。しかし近年、ゼブラフィッシュの体色変化には視覚とは別の経路が関与するという仮説が提唱された [Muto *et al.* 2005]。私たちもゼブラフィッシュ幼生において視細胞の選択的欠損実験を行い、背地適応には視細胞は必要でないことを明らかにしている[未発表]。このことから、網膜の「視細胞以外のニューロン」が体色変化の光制御に関与することが強く示唆された。興味深いことに、ゼブラフィッシュ網膜の高次ニューロンの一部はロドプシンに類似した光受容分子群(非視覚型オプシン)を発現することがわかっている [Kojima *et al.* 2000; 2008; Davies *et al.* 2011; Matos-Cruz *et al.* 2011]。これらの知見を考え合わせると、体色変化を光制御する光受容細胞は非視覚型オプシンを発現する網膜ニューロンである可能性が高い(図2)。

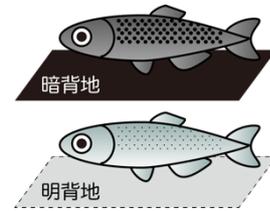


図1: 真骨魚類の背地適応

一方、申請者は最近、ゼブラフィッシュの発生過程で体色変化パターンが「幼生型」から「成魚型」へと変化することを見出した [Shiraki *et al.* 2010; 図3]。体表に色素細胞が顕在化する2日齢幼生では、5日齢で見られる背地適応(成魚型)とは逆に、光依存的に体色が暗化した(幼生型)。さらに、2日齢の体色暗化を駆動する光受容部位は、眼球ではなく、尾部(おそらく色素細胞内)にあることがわかった。これらの結果から、どのような光受容分子が幼生型の体色変化を駆動するのか、また、幼生型から成魚型への行動様式のスイッチングがどのようなメカニズムで起こっているのか、が未解決の問題として浮かび上がってきた。

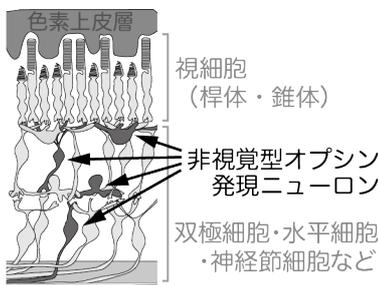


図2: 網膜を構成する細胞群

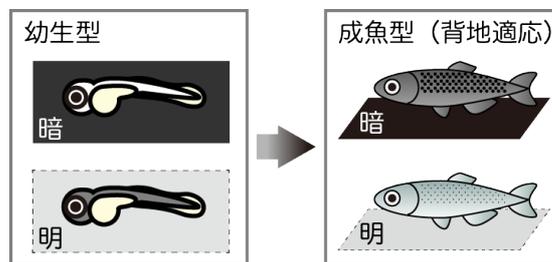


図3: 体色変化のスイッチング

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、動物の光環境応答、とくに体色変化に関与する光受容分子・光受容ニューロンを同定し、体色変化の光制御の最初期過程を明らかにすることである。申請者は最近、野生型ゼブラフィッシュ幼生の体色変化の光作用スペクトルを測定することに成功し、この光応答には少なくとも2種類の光受容分子・光受容細胞が関与することが示唆された(図4)。そこで本研究ではまず、この光作用スペクトル測定系を用いて視細胞欠損個体を解析することにより、視細胞と他の網膜ニューロンがそれぞれ体色変化に寄与する度合いを検証する。次に体色変化を制御する光受容分子の候補として、ゼブラフィッシュ眼球での発現が確認されている非視覚型

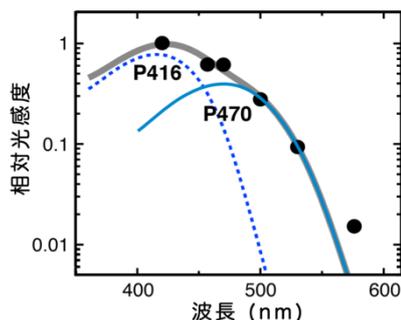


図4: 背地適応における光作用スペクトル  
オプシン型光受容分子の鑄型スペクトルによるフィッティングを行ったところ、416 nm および 470 nm にそれぞれ極大をもつ、2種類の仮想的なオプシンが寄与することが示唆された。

オプシン遺伝子群の中から、網膜高次ニューロンに発現する非視覚型オプシンを同定し、さらに薬理的な機能阻害実験等により候補遺伝子を絞り込む。これら候補遺伝子のノックアウト系統を樹立し、非視覚型オプシンの体色変化への寄与を精査する。また、これら非視覚型オプシンを発現する細胞が生体組織において光応答するかどうかを、イメージング装置を用いて検証する。以上の「成魚型」体色変化の光制御メカニズム解析とともに、「幼生型」体色変化に関与する光受容分子の同定・解析を行い、体色変化の光センシング機構が個体の発生過程でどのようにスイッチングするのかを、比較解析する。

### 3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュ幼生の体色変化測定：ゼブラフィッシュ幼生（2もしくは5日齢）をアガロースゲル中に生きたまま無麻酔で保定し、図5のような測定装置のステージにセットした。赤外光と CCD カメラを用いて体色（メラニン色素の分布）を経時的にイメージ取得し、刺激光として可視光（白色光もしくは単一波長光）を幼生の腹側から照射した。

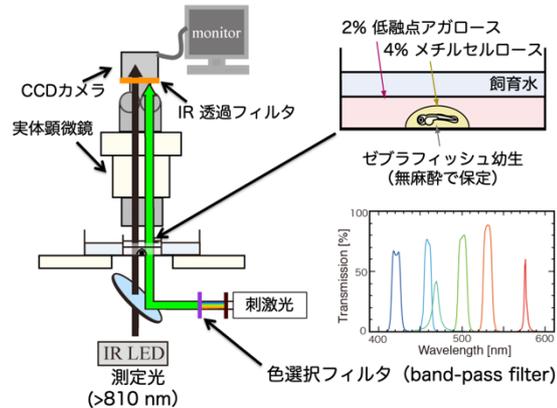


図5：体色変化測定装置の概略

(2) ノックアウト系統の作製：CRISPR/Cas9法を用いたゲノム編集により、視物質および非視覚型オプシン遺伝子のノックアウト（KO）ゼブラフィッシュ系統を樹立した。

(3) 視細胞の選択的破壊：これまでの研究において樹立した、視細胞特異的に Nitroreductase (NTR) -mCherry 融合遺伝子を発現する組換えゼブラフィッシュ系統を用いた。この系統の幼生に至適濃度のプロドラッグ（Mtz）を投与することにより、視細胞が選択的に破壊された個体を作製した。

### 4. 研究成果

(1) 体色変化測定装置の改良：本研究では様々な遺伝子型の個体群に対して、多数の刺激光条件で体色変化を測定する必要があった。そこでまず、作業効率を高めるため、測定装置を改良した。具体的には、2種類の光源による照射を自動的に切替えるシステムを構築し、測定開始から終了までを無人状態で半自動的に測定できるようにした。これにより測定精度も向上した。また装置の増設なども行い、従来の4倍の個体数を測定することが可能となった。

(2) 視細胞欠損個体の体色変化測定：これまでの私たちの研究により、5日齢幼生の背地適応型の体色変化には、波長感度の異なる2種類の仮想的な光受容分子、P416とP470の関与が示唆されていた（図4）。これらが視細胞に存在するか否かを検証するため、視細胞欠損個体を用いて単一波長光の照射による体色変化の測定を行った。その結果、波長500nmの緑色光に対する光応答性は正常であったのに対し、420nmの紫色光に対する光応答が有意に減弱した。このような波長依存性から、P416は視細胞に存在し、一方、P470は視細胞以外の網膜ニューロンに存在することが強く示唆された。

(3) メラノプシン遺伝子群の機能阻害実験：メラノプシン遺伝子群は470nm付近に吸収極大をもち、ゼブラフィッシュ網膜の視細胞以外のニューロンに存在することが知られている。上述の視細胞欠損個体の研究結果より、メラノプシン遺伝子群はP470の有力な候補であると考えられた。そこで、哺乳類メラノプシンに対する阻害剤（Opsinamide）を用いた実験を行った。まず、ゼブラフィッシュの5種類のメラノプシン遺伝子をそれぞれ培養細胞で発現させ、メラノプシンの光応答に対するOpsinamideの阻害効果を調べた。その結果、一部のメラノプシン遺伝子を発現させた場合において、Opsinamide投与による光応答減弱が認められた。そこで次に、Opsinamideを投与した5日齢幼生の体色変化を測定したところ、500nmの緑色光に対する体色変化量が有意に減少した。これらの結果から、これらメラノプシン遺伝子群のいずれかがP470として体色変化の光制御に関与することが示唆された。

(4) メラノプシン遺伝子群のノックアウト系統の体色変化測定：上述のように、体色変化を光制御する光受容分子P470の有力な候補として、メラノプシン遺伝子群の関与が示唆された。そこで、ゼブラフィッシュの5種類のメラノプシン遺伝子群をターゲットとしてゲノム編集を行

い、5種類のメラノプシン遺伝子すべてのノックアウト系統を樹立した。それぞれの系統のホモ接合個体を取得して体色変化を測定し、野生型と比較したところ、ある単一のメラノプシン遺伝子のノックアウト系統において緑色光に対する光応答性の減弱が見られることがわかった。このメラノプシン遺伝子がP470として体色変化を光制御すると考えられる(図6)。

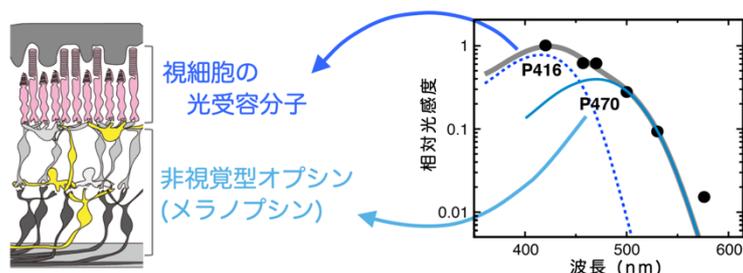


図6：背地適応型の体色変化を光制御する光受容分子

(5) 視物質遺伝子のノックアウト系統の体色変化測定：上記(2)で述べたように、体色変化を制御するもう一つの光受容分子P416は視細胞に存在すること、すなわち視物質であることが示唆された。ゼブラフィッシュの視物質のうち、416 nmに吸収極大が最も近いのが、青色感受性の錐体オプシン(sw2オプシン)である。そこで、CRISPR/Cas9法を用いたゲノム編集により、sw2オプシン遺伝子のノックアウト系統を樹立した。この系統のホモ接合個体を取得して体色変化を測定して野生型と比較したところ、青色光に対する体色変化量に有意な差は検出されなかった。また、緑色感受性の錐体オプシン遺伝子発現を欠損する変異体 [Ogawa *et al.* *PRSB* 2015]を用いて同様の実験を行なったが、青色光に対する応答に有意な差は見られなかった。P416はこれらの錐体オプシンとは別の、視細胞に存在する光受容分子であると考えられる(図6)。

(6) 背地適応型の体色変化を制御するオプシン遺伝子の発現細胞の可視化：上記(4)で同定したP470相当遺伝子(メラノプシンの一つ)の発現細胞を可視化するため、この遺伝子プロモータ直下に蛍光タンパク質Venus遺伝子を結合したDNAコンストラクトを作製し、これを用いて組換えゼブラフィッシュ系統を樹立した。その結果、この組換え個体の網膜において、P470相当遺伝子を発現する細胞(一部の双極細胞)にVenus由来の蛍光が観察された。また、従来から背地適応の光制御に主要な役割を果たすと考えられている「背側網膜」において、P470相当遺伝子の発現がより強いことがこの解析によって明らかになった。さらにこのP470発現細胞の光応答測定に向けて、組換え個体の網膜ニューロンを分散培養する条件を検討した。光応答測定用の顕微鏡システムを用いた観察の結果、培養条件下で単離P470発現細胞を特定することに成功した。

(7) 幼生型の体色変化における刺激光の波長依存性：2日齢幼生は上述の成魚型とは異なる体色変化(幼生型)を示す。幼生型体色変化を制御する光受容分子の波長特性を推定するため、2日齢幼生において、420~580nmの単一波長の刺激光に対する体色変化を調べた。各波長における光強度と応答の大きさ(体色変化量)の関係を測定した結果、体色変化の波長依存性が成体型とは明確に異なることが明らかになった。幼生型の体色変化には成体型とは別の光受容分子群が関与すると考えられる。

(8) 青と緑の錐体オプシンの遺伝子発現を制御する鍵分子の同定：脊椎動物の祖先種は色センサー分子として4種類の錐体オプシン(紫・青・緑・赤)をもち、4色型の色覚が原型であると考えられているが、青と緑の錐体オプシンが果たす役割やそれらの遺伝子制御の仕組みは謎に包まれていた。動物の光環境応答の分子メカニズムを解明する一環として、網膜錐体に発現する遺伝子群を機能解析した結果、青と緑の錐体オプシンの遺伝子発現を制御する鍵分子として、ホメオボックス型転写因子Six6とSix7を特定した。Six6とSix7の両者を欠損させると青と緑の錐体オプシンの遺伝子発現が消失すること、また、これら錐体オプシン遺伝子近傍のゲノム領域にSix6とSix7が結合することから、両者が協調的に遺伝子発現を制御することがわかった。さらに、Six6とSix7を欠損させると動物の摂餌能力が著しく低下することから、青色~緑色の波長領域の視覚感度が動物の生存に重要な役割をもつことが示唆された。この成果は国際誌 [Ogawa *et al.* *PNAS* 2019] に報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件) #責任著者, \*同等貢献

- ① Yohey Ogawa, Tomoya Shiraki, Yoshimasa Asano, Akira Muto, Koichi Kawakami, Yutaka Suzuki, Daisuke Kojima<sup>#</sup>, Yoshitaka Fukada<sup>#</sup>: Six6 and Six7 coordinately regulate expression of middle-wavelength opsins in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**, 4651-4660, 2019, DOI: 10.1073/pnas.1812884116
- ② Masaki Torii, Daisuke Kojima<sup>#</sup>, Akiyuki Nishimura Hiroshi Itoh, Yoshitaka Fukada<sup>#</sup>: Light-dependent activation of G proteins by two isoforms of chicken melanopsins. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 1991-1997, 2015
- ③ Yohey Ogawa<sup>\*</sup>, Tomoya Shiraki<sup>\*</sup>, Daisuke Kojima, Yoshitaka Fukada: Homeobox transcription factor Six7 governs expression of green opsin genes in zebrafish. *Proc. R. Soc. B* **282**, 20150659, 2015

〔学会発表〕(計24件)

- ① 小島 大輔, 中波長領域感受性の錐体型光受容タンパク質の発現制御メカニズム, 第91回日本生化学会大会, 2018 (招待講演)
- ② Yohey Ogawa, Molecular mechanism for gene expression of middle wavelength-sensitive visual opsins in zebrafish, *18<sup>th</sup> International conference on Retinal Proteins*, 2018 (国際会議)
- ③ 小島 大輔, ゼブラフィッシュの体色変化を制御する光受容体, 日本動物学会第89回大会, 2018 (招待講演)
- ④ 小島 大輔, ゼブラフィッシュの体色変化を制御する網膜光受容体の同定, 視覚科学フォーラム 第22回研究会, 2018
- ⑤ Daisuke Kojima, Retinal photoreceptors regulating light-induced body color changes in larval zebrafish, *FASEB Summer Research Conference: Retinal Neurobiology and Visual Processing*, 2018 (国際会議)
- ⑥ 小島 大輔, ゼブラフィッシュ幼生の体色変化を制御する光受容機構, 日本比較生理生化学会第39回大会, 2017 (招待講演)
- ⑦ Daisuke Kojima, Photoreceptor system mediating light-induced body color changes in larval zebrafish, *The 8th Asia & Oceania Conference on Photobiology*, 2017 (国際会議, 招待講演)
- ⑧ 小島 大輔, ゼブラフィッシュ幼生の体色変化を制御する光受容分子の同定, 日本動物学会第88回大会, 2017
- ⑨ Daisuke Kojima, Multiple types of retinal photoreceptors regulate light-induced body color changes in larval zebrafish, *FASEB Summer Research Conference: The Biology and Chemistry of Vision*, 2017 (国際会議, 招待講演)
- ⑩ Daisuke Kojima, Photoreceptive molecules regulating body color changes in larval zebrafish, *International Symposium on Biophysics of Rhodopsins*, 2017 (国際会議, 招待講演)
- ⑪ Daisuke Kojima, Multiple types of retinal photoreceptors control background adaptation in larval zebrafish, *Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan*, 2016 (国際会議)
- ⑫ 小島 大輔, ゼブラフィッシュ幼生の体色変化を制御する網膜光受容体, 第19回日本光生物学協会年会, 2016
- ⑬ Daisuke Kojima, Multiple types of retinal photoreceptors mediate background adaptation in larval zebrafish, *The 7th Asia & Oceania Conference on Photobiology*, 2015 (国際会議, 招待講演)
- ⑭ 小島 大輔, ゼブラフィッシュ幼生の体色変化を引き起こす網膜光受容体, 日本動物学会第86回大会, 2015
- ⑮ Daisuke Kojima, Retinal photoreceptors for body color change in zebrafish, *The 9th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry*, 2015. (国際会議, 招待講演)
- ⑯ Daisuke Kojima, Photoreceptors mediating background adaptation in zebrafish, *FASEB Summer Research Conference: The Biology and Chemistry of Vision*, 2015 (国際会議)

(他8件)

〔図書〕(計4件)

- ① 小島 大輔 他 (分担執筆), 動物の事典(朝倉書店), 印刷中
- ② 小島 大輔 他 (分担執筆), 動物学の百科事典(丸善出版), pp 408-409, 2018
- ③ 小島 大輔 他 (分担執筆), 光と生命の事典 (朝倉書店), 208-209, 2016
- ④ 小島 大輔 他 (分担執筆), 研究者が教える動物実験 第1巻(共立出版),138-141, 2015

〔その他〕

ホームページ等

[https://researchmap.jp/daisuke\\_kojima/](https://researchmap.jp/daisuke_kojima/)

【researchmap, 小島大輔】

<http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/fukada-lab/index-j.html>

【東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻 神経機能生化学研究室】

<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2019/6254/>

【東京大学大学院理学系研究科プレスリリース：青や緑の色覚遺伝子を制御する分子】

<https://www.youtube.com/watch?v=mMuCtVpJaeY&feature=youtu.be>

【東京大学大学院理学系研究科 シリーズ『研究室の扉』

「青と緑の色センサーを制御する分子」】

## 6. 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鳥居 雅樹

ローマ字氏名：(TORII, Masaki)

研究協力者氏名：小川 洋平

ローマ字氏名：(OGAWA, Yohey)

研究協力者氏名：伊藤 百合香

ローマ字氏名：(ITO, Yurika)

※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。