

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月2日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06174

研究課題名(和文)網膜光受容体メラノプシンの分子解析から迫る哺乳類の行動・生理の光制御機構

研究課題名(英文)Roles of a circadian photopigment melanopsin in mammals

研究代表者

羽鳥 恵 (Hatori, Megumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授

研究者番号：90590472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：目に存在する光受容細胞は視細胞層を構成する桿体・錐体だけではない。一部の光受容網膜神経節細胞は青色光受容体メラノプシンを発現し、概日光応答や瞳孔収縮など引き起こす。メラノプシンは桿体・錐体のオプシンとは異なり、無脊椎動物のオプシンに類似しており、明るい光に反応して活性を持続するユニークな光受容体である。メラノプシン発現網膜神経節細胞内で光情報がいかに制御されているのかの解明に取り組んだ。メラノプシンが光刺激後にリン酸化され、アレスチンを介して不活性化されること、およびこの過程に必要な細胞内アミノ酸残基を見出した。さらに、小型昼行性霊長類であるコモンマーモセットを用い、概日時計研究を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わたしたちの睡眠・覚醒やホルモン分泌など、様々な生理機能は一日を周期として変化し、日々繰り返されます。このリズムを制御しているのが概日時計です。概日時計の周期は24時間ぴったりではないため、光を浴びることや食事を摂取することにより、時間のずれを毎日補正しています。地球上には昼行性生物と夜行性生物が存在するため、両者のモデル生物を使用することにより、概日時計の機能の理解に近づくことができます。その一例として、目に発現して青色光を感じるタンパク質メラノプシンの機能解析を行いました。今後はメラノプシンの機能を調節する薬剤などの解析が進み、生体機能の維持および健康の増進の一助となると期待されます。

研究成果の概要(英文)：In mammalian retinas, there are three photoreceptors: rods, cones and melanopsin-expressing retinal ganglion cells. Rods and cones are responsible for image forming vision. In contrast, melanopsin-expressing retinal ganglion cells contribute to non-image forming visions, such as circadian photoentrainment and pupil constriction. Melanopsin is a GPCR which can be activated by 460-480 nm light, and its light response properties are different from those of rods and cones. We had revealed phosphorylation of and Arrestin binding to the C-terminus cytosolic region of melanopsin is responsible for the shut-off mechanism after light pulse.

研究分野：動物生理

キーワード：概日時計 目 メラノプシン 非視覚応答 光受容体

1. 研究開始当初の背景

目に存在する光受容細胞は視細胞層を構成する桿体・錐体だけではない。mRGC と呼ばれる光受容網膜神経節細胞 (図) はオプシン型 GPCR であるメラノプシン (Opn4) を発現し、概日時計の光応答や瞳孔収縮などの視覚以外の光応答、すなわち非視覚応答を引き起こす。メラノプシンをノックアウトすると非視覚応答は減弱するが消失せず、桿体・錐体の関与が考えられた。メラノプシン Cre (Opn4Cre) マウスを用いて mRGC だけを成体から除去した。その結果、桿体・錐体が存在するにも関わらず非視覚応答が消失し、mRGC が非視覚応答の統合と伝達に必要な不可欠であることを発見した。さらに Opn4Cre マウスを使用し、非視覚応答を担う脳領域にとどまらず、視覚情報に寄与する外側膝状体や上丘に対する mRGC からの投射を認めた。併せて視覚野の神経発火応答を測定し、mRGC が視覚応答にも寄与することを見出した。これらの発見は他研究者らによってもそれぞれ同年に報告され、激しい競争となっている。「メラノプシンとは何か」という基礎研究と併行し、目だけでなく全身に与える影響へと研究が展開している。遺伝子破壊マウスを用いた解析によりメラノプシンが活動時間や気分に関与する可能性が報告されている。日常生活に普及している白色 LED の主成分は青色であり、青色光が健康状態に与える影響の理解は喫緊の課題である。

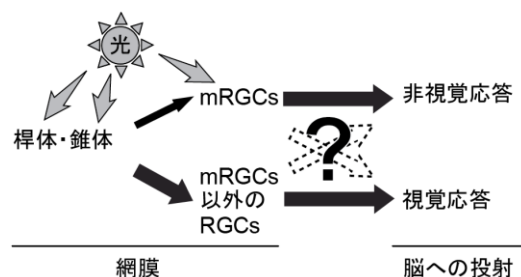


図 網膜の3種の光受容細胞

マウス mRGC 特異的にジフテリア毒素受容体を発現させ、ジフテリア毒素を注入して mRGC の消失を誘導したところ、非視覚応答が阻害された (「mRGCs 以外の RGCs」から「非視覚応答」への矢印が否定された)。実線矢印の幅は情報伝達の程度を反映している。RGC; retinal ganglion cell, mRGC; melanopsin-expressing RGC

2. 研究の目的

哺乳類の網膜神経節細胞の 2~3% は青色光受容体メラノプシンを発現することで、桿体・錐体に加え第三の光受容細胞として機能し、概日時計の光応答など視覚以外の光反応を担う。光による概日時計の攪乱は多様な疾患を引き起こすことから、メラノプシンの分子機能と制御機構の理解が必須である。本研究は桿体・錐体とは全く異なる特徴をもつメラノプシン細胞に注目して光情報伝達、細胞特異的な遺伝子発現制御、および昼行性霊長類での機能を分子・細胞・個体レベルで統合的に解析する。これまでに開発した低分子化合物などのユニークなツールを活用し、メラノプシンのどの部位が光応答性に重要か、いかなる分子が非視覚応答に寄与するのか、光の効果は昼行性・夜行性生物でどう異なるのか、という本質的な疑問に答える。

3. 研究の方法

メラノプシンの性質を明らかにするためランダムミュータジェネシスおよび特定の領域を狙う変異体作製を同時並行させ変異体を作製する。哺乳類培養細胞を暗黒条件下で維持し、メラノプシン変異体を細胞に発現させ、青色光を照射によるカルシウム濃度の変化、つまりメラノプシンの光応答を *in vitro* で測定する。光応答変異体を単離することが出来た場合には、得られた変異体を組換えアデノ随伴ウイルスベクターを用いてマウスの網膜神経節細胞に発現させて非視覚応答を測定し、変異部位の意義を *in vivo* で評価する。同様に、メラノプシンと相互作用する候補因子についても組換えアデノ随伴ウイルスベクターを用いてマウス生体で機能評価を実施する。

4. 研究成果

メラノプシンは桿体・錐体のオプシンとは異なり、無脊椎動物のオプシンに類似しており、明るい光に反応して活性を持続するユニークな光受容体である。視覚応答・非視覚応答を理解するために、メラノプシン発現網膜神経節細胞内で光情報がいかに制御されているのかの解明に取り組んだ。

メラノプシンが光刺激後にリン酸化され、アレクチンを介して不活性化されること、および

この過程に必要な細胞内アミノ酸残基を見出した。具体的には、メラノプシンは GPCR ファミリーの中でも長い細胞内 C 末端を保有しており、その C 末端領域内に種間で保存されているセリンスレオニン領域を見出した。その領域のアレスチンによるリン酸化が光応答の終了スピードを規定していること (*Neuron* 2016)、さらには、 β Arrestin 2 と β Arrestin 1 の両者がメラノプシン細胞に発現し、光応答終了過程とメラノプシン再生に寄与することを、それぞれの遺伝子破壊マウス等を用いて明らかにした (*Cell Reports* 2018)。

さらに、ラットと同程度の重量の小型昼行性霊長類であるコモンマーモセット *Callithrix jacchus* を用い、概日時計研究を開始した (論文投稿中)。

メラノプシンを標的とした薬剤スクリーニングを行い、8 万個の化合物からメラノプシン特異的アンタゴニストを同定した (*Nature Chemical Biology* 2013)。この化合物はマウス個体において瞳孔収縮や光を痛みと感じることによる回避行動を減弱させた。このメラノプシンアンタゴニストを利用し、霊長類での非視覚入力メカニズムを世界で初めて明らかにする足がかりとすることを長期的な目的とした。進化的にヒトにより近く昼行性である霊長類のコモンマーモセットに投与して mRGC 機能の薬理的な調節を可能にすると共に、アンタゴニストを投与された動物を詳細に観察することによってメラノプシンの新規機能を見出す。この実験の準備段階として以下の結果を得た。

コモンマーモセットのゲノム情報およびゲノム PCR を組み合わせてメラノプシンの塩基配列を決定した。この配列に基づいてプローブを設計し、自然死を迎える個体からの死後組織供与を受けて網膜切片に対する *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、コモンマーモセットの網膜にメラノプシン mRNA の発現を見出した。メラノプシンは青色に吸収極大をもち、光の照射によりイノシトールトリスリン酸経路が活性化され細胞内のカルシウム濃度が上昇する。哺乳類培養細胞にメラノプシンを強制発現させ、青色光を照射したのち細胞内のカルシウム濃度を測定してメラノプシンの活性化レベルの変化を評価する系を立ち上げた。この系を用いて、マウス、コモンマーモセットおよびヒトのメラノプシンの青色光照射による応答を測定した。上記 3 種いずれの生物のメラノプシンでも青色光による活性化が観察され、その光応答性はメラノプシン阻害剤の投与によって用量依存的に減弱した。クローニングしたコモンマーモセットのメラノプシンが光受容体として作用しうる可能性とメラノプシン阻害剤の有効性を支持した。メラノプシン阻害剤を成体に投与して pharmacokinetic assay を行い、安全性に問題がないこと、および非視覚応答への影響を解析するにあたり最適な時間幅を明らかにした。メラノプシンの霊長類における *in vivo* の機能を明らかにするべく、様々な非視覚応答の測定系を検討している。安定性が高く、かつ動物の苦痛度が最も低い方法を最優先している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件、すべて査読有)

1. Mure LS, **Hatori M**, Ruda K, Benegiamo G, Demas J and Panda S. Sustained Melanopsin Photoresponse Is Supported by Specific Roles of β -Arrestin 1 and 2 in Deactivation and Regeneration of Photopigment. *Cell Reports* 25:2497-2509 (2018) doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.008.
2. **Hatori M# (#Correspondence)**, Gronfier C, Van Gelder RN, Bernstein PS, Carreras J, Panda S, Marks F, Sliney D, Hunt CE, Hirota T, Furukawa T and Tsubota K. Global rise of potential health hazards caused by blue light-induced circadian disruption in modern aging societies. *Npj Aging and Mechanisms of Disease*. 3:9 (2017) doi: 10.1038/s41514-017-0010-2.
3. Torii H, Kurihara T, Seko Y, Negishi K, Ohnuma K, Inaba T, Kawashima M, Jiang X, Kondo S, Miyauchi M, Miwa Y, Katada Y, Mori K, Kato K, Tsubota K, Goto H, Oda M, **Hatori M** and Tsubota K. Violet Light Exposure Can Be a Preventive Strategy Against Myopia Progression. *EBioMedicine* 15: 210-219 (2017) doi: 10.1016/j.ebiom.2016.12.007.
4. Mure LS*, **Hatori M* (* equal contribution)**, Zhu Q, Demas J, Kim IM, Nayak SK, and Panda S. Melanopsin-encoded response properties of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron* 90: 1016-1027 (2016) doi: 10.1016/j.neuron.2016.04.016.

[学会発表] (計 10 件)

1. **Hatori M.** Functional relevance of circadian timing on metabolism in primates. ERATO/AMED-CREST/PRESTO 共催 国際シンポジウム Organismal and Systems Biology of Inter-Organ Communication-Indra's Net of the Body- 2017 年
2. **羽鳥 恵** 概日時計の光受容体メラノプシンの機能と制御 創薬薬理フォーラム第 25 回シンポジウム 2017 年
3. **羽鳥 恵** 食事タイミングと肥満 第 90 回日本内分泌学会学術総会 2017 年
4. **羽鳥 恵** 概日光受容体メラノプシンの機能と性質 第 94 回日本生理学会大会 2017 年
5. **羽鳥 恵** 肥満と時間栄養学 第 20 回日本病態栄養学会年次学術集会 2017 年
6. **羽鳥 恵** メラノプシン発現網膜神経節細胞の光情報伝達機構 第 23 回時間生物学会学術大会 2016 年
7. **Hatori M.** Light reception in retinal ganglion cells and its role in the circadian clockwork and non-image forming visual responses. 生物リズムに関する札幌シンポジウム 2016 2016 年
8. **Hatori M.** Blue light reception in retinal ganglion cells and its role in the clockwork. International Society for Eye Research 2016 2016 年
9. **羽鳥 恵** メラノプシンの光応答終了機構の解析 第 19 回日本光生物学協会年会 2016 年
10. **羽鳥 恵** 青色光受容体メラノプシンの概日リズムに対する効果 第 16 回日本抗加齢医学界総会 2016 年

[図書] (計 7 件)

1. 孫 ユリ、**羽鳥 恵** 第 3 章 5. 近視とサーカディアンリズム 単行本 診療で役立つ 近視進行予防のサイエンス 金原出版株式会社 141-148 (2019)
2. **羽鳥 恵**、廣田 毅 時計遺伝子から考える脳機能と食 FOOD STYLE 21 食品化学新聞社 23(1): 80-83 (2019)
3. **羽鳥 恵** 第三の光受容器 ipRGC 眼科 金原出版株式会社 59(8): 797-802 (2017)
4. **羽鳥 恵** 概日時計と老化 Clinical Calcium 老化と生体恒常性 医薬ジャーナル社 27(7): 955-961 (2017)

5. 津山 淳、羽鳥 恵 概日時計システムと老化 日本臨牀 特集：老化制御と疾患 II. 老化制御因子 日本臨牀社 74(9): 1474-1478 (2016)
6. 羽鳥 恵 ブルーライト研究の歴史と概日時計との関わり 単行本 ブルーライトテキストブック 金原出版株式会社 146-151 (2016)
7. 羽鳥 恵 網膜 - 視床下部の光応答 光と生命の事典 真嶋哲朗・飯野盛利・七田芳則・藤堂剛 編 朝倉書店 214-215 (2016)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。