

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15159

研究課題名(和文)逆方向光受容体Opn5L1の生理機能の同定

研究課題名(英文)Identification of physiological function of reverse photoreceptor, Opn5L1

研究代表者

佐藤 恵太 (Sato, Keita)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80725622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：逆方向光受容体Opn5L1の生理機能を調べるため、Opn5L1発現細胞に特異的にレポーター遺伝子(コムギ胚芽凝集素、緑色蛍光タンパク質、ニトロレダクターゼ)を発現するメダカの作製を試みた。遺伝子組み換えメダカを作製するため、Opn5L1プロモーター下でCREを発現するベクターと、アクチンプロモーター下CRE依存的にレポーター遺伝子を発現するベクターで、心筋の蛍光観察によって遺伝子導入の可否をスクリーニングできるベクターを構築した。また、遺伝子組み換えメダカの行動を様々な光環境において半自動的に記録し、解析するための装置を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光が動物の生理機能におよぼす影響についての理解は、太陽光、月光、あるいは生物発光や人工的な光など様々な光源が存在するこの世界にヒトを含む動物がどのように適応し、生活しているかを理解するために重要である。形・色・動きを捉えるための光受容システムである視覚は非常によく研究が進んでいるが、非視覚性の光受容システムに関してはまだまだ知見が少ない。

本研究の成果をもとにトランスジェニック動物を作製し、解析を進めることによって、非視覚性の光受容に関する理解が進み、動物がどのように光を利用するかについて理解が広がると期待される。

研究成果の概要(英文)：To clarify the physiological function of reverse photoreceptor Opn5L1, an attempt was made to develop a transgenic medaka fish which expresses a reporter gene such as wheat germ agglutinin, green fluorescent protein, or nitroreductase specifically in the Opn5L1-positive cells. For development of a transgenic medaka, the two plasmid vectors were constructed. One carries CRE recombinase under the Opn5L1 promoter and green fluorescent protein under the cardiac muscle-specific promoter. The other carries reporter gene with the upstream floxed transcription stop cassette under beta-actin promoter and red fluorescent protein under the cardiac muscle-specific promoter. Additionally, the apparatus which semi-automatically records and analyzes the behavior of transgenic medaka fishes under various lighting conditions was constructed.

研究分野：光生物学

キーワード：光受容 非視覚性光受容 オプシン

## 1. 研究開始当初の背景

動物の光受容を担うタンパク質であるオプシンは、ビタミンAのアルデヒド型(レチナール)を発色団兼リガンドとするGタンパク質共役型受容体の一種である。最もよく知られているオプシンとして、視覚において働く視物質がある。多くの動物のゲノム上には視物質以外にもオプシン遺伝子が存在し、それらは網膜の視細胞以外の細胞や、脳の神経細胞の一部に発現して視覚以外の光受容を担っている。これらのオプシンは総称して非視覚オプシンと呼ばれる。オプシン5(Opn5)は哺乳類から円口類まで脊椎動物で保存されている非視覚オプシンの一種である。哺乳類はただ一つのOpn5を持つのに対して、哺乳類以外の脊椎動物は複数のOpn5ホモログを持つ。申請者はこれまでOpn5ホモログの一つ、Opn5L1の分子特性に関する研究を行ってきた。Opn5L1は全トランス型のレチナールを直接結合して活性化し、光を受容することでレチナールと近傍のシステインとで共有結合を作って不活性化状態を形成する。そして不活性化状態から全トランス型結合状態へ熱反応で自発的に戻る。この性質はこれまで既知のどのオプシンの性質とも著しく異なる。光で活性化される典型的なオプシンを「順方向光受容体」とすれば、光を不活性化にのみ用いるOpn5L1は「逆方向光受容体」といえる。

脊椎動物の光受容システムについては、まず視覚の研究、次いで概日リズムに関わるメラノプシンの研究が先行している。その他の非視覚性オプシンによる光受容システムの機能研究は今後発展が見込まれる課題である。視覚においては光受容分子の分子特性と生理機能には深い関連性があることがわかっている、Opn5L1の特異な分子特性も生理機能と関連している可能性があると考えられる。

## 2. 研究の目的

光が動物にどのような影響をおよぼすか、ということに関する理解は太陽光、月光、あるいは生物発光や人工的な光を含め、様々な光源が存在するこの世界において、動物がどのように生活しているかを理解するために重要である。ヒトにおいても季節性情動障害や概日リズムの光同調の例に見られるように、形態視以外の光受容と肉体的・精神的な健康状態は密接に結びついている。しかし、非常によく研究が進んでいる視覚系に比べ、非視覚性の光受容に関する知見はまだ少ない。本研究では、光受容分子オプシンの中でも特異な性質を持つOpn5L1が、どのような生理機能に関わるのか、またこの分子特性が生理機能とどのように結びついているのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

小型魚類メダカは卵や胚が透明であり、成魚でもシロメダカやヒメダカと言った系統は全身の透明度が高く、光の影響を調べる実験に適した動物である。またゲノム情報やBACクローンなどのリソースが整備されている。よって本研究ではメダカをモデル動物としてOpn5L1が関与する生理機能を明らかにすることを目指した。特に神経系におけるOpn5L1の機能を明らかにすることを目指し、遺伝子組み換えメダカを創出し、解析することを目指した。

メダカは3つのOpn5L1パラログを持つ(Opn5L1a, Opn5L1b, Opn5L1c)。これらのOpn5L1発現細胞で神経トレーサーを発現するトランスジェニックメダカを作製するため、各Opn5L1の上流配列をゲノムからクローニング、コムギ胚芽凝集素(WGA)-2Aペプチド-GFPに連結し、さらにその全体をDissociater(Ds)トランスポゾン配列ではさんだ遺伝子コンストラクトを構築する。これをActivator(Ac)トランスポゼース発現プラスミドとともにメダカ受精卵の1細胞期胚に顕微注入する。孵化したメダカのジェノタイプピングを行い、遺伝子が導入されたメダカについて野生型と掛け合わせ、次世代のメダカを取得する。次世代のジェノタイプピングを行い、生殖細胞系列で組換えが起こっている個体(ファウンダー)を選別する。ファウンダーから得られた次世代のメダカについてGFPの蛍光観察と、抗WGA抗体で染色しての観察を行う。WGAはシナプスを超えて輸送されることが期待でき、Opn5L1発現細胞から投射を受ける細胞が可視化される。

メトロニダゾール(Mtz)はそのままでは無害だが、微生物由来の酵素ニトロレダクターゼ(Ntr)によって還元されると細胞傷害活性をもつようになる。よってNtrを遺伝子導入した動物を作ると、Mtzを投与することでNtr発現細胞のみを破壊することができるOpn5L1のプロモーター下でNtrを発現するメダカを作製することを計画した。Mtz投与前後で視運動反応、視機性反応、概日リズムを測定し比較することを計画した。

Opn5L1ノックアウトメダカ、Opn5L1構成的活性化変異ノックインメダカを作製し、組織の形態、行動の野生型と比較しての変化を捉えることを計画した。

## 4. 研究成果

(1)Opn5L1陽性細胞特異的にレポーター遺伝子を発現するトランスジェニックメダカ作製のためのベクター構築

マイクロインジェクションに用いる Ac トラंसポゼースタンパク質を得るため、His6 タグを融合した Activator(Ac)トラंसポゼースを大腸菌で発現し、精製することを試みた。しかし、一般的な pET システムを用いたタンパク質の発現法では発現量・精製効率共に低く、メダカ卵へのマイクロインジェクションに用いることが可能なレベルの試料を調製できないことがわかった。そこで、Ac を発現するベクターを構築し、マイクロインジェクションすることにした。メダカゲノムから Opn5L1a、b、c の各遺伝子について、上流領域 5000bp をクローニングした。一方レポーター遺伝子として、WGA に 2A ペプチド、EGFP を連結したものを構築した。誘導された mRNA の安定化のため、メダカアクチン遺伝子の 3' UTR を 3' 側に配置した。これらを連結し、Dissociator トラंसポゾン (Ds5', Ds3') 配列の間に配置したものを作製した。実験のポジティブコントロールとして、

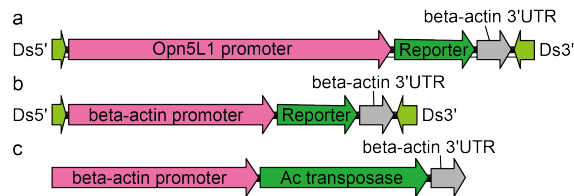


図1 ターゲッティングベクターと Ac 発現ベクターの設計

アクチンプロモーターにレポーター遺伝子、3' UTR を連結したものを構築した。また Ac の発現ベクターとして、アクチンプロモーターと 3' UTR の間に Ac を連結したものを作製した。これらをメダカ卵へマイクロインジェクションしたところ、アクチンプロモーター+レポーター遺伝子を打ち込んだメダカ卵では蛍光を示す胚を確認できたが、発生段階で形態に異常をきたし、孵化前に死んでしまった。一方、Opn5L1 プロモーター+レポーター遺伝子をインジェクションしたメダカ卵から得た稚魚について、孵化から約 1 ヶ月後、尾ビレからゲノムを抽出し、PCR により遺伝子導入の検証を行った。しかし、遺伝子の導入は確認できなかった。そこで、遺伝子導入に用いるコンストラクトを見直すことにした。

図2に新規に設計した遺伝子コンストラクトを示す。まず遺伝子導入の可否を容易にスクリーニングするため、ゼブラフィッシュで頻用される、ゼブラフィッシュ心筋特異的プロモーター (cmlc2 promoter) と蛍光タンパク質 (EGFP または mRFP) の組み合わせを用いることとした。これにより心臓の蛍光観察を行うことで孵化前の段階で遺伝子導入の可否が判定可能になる。また、Opn5L1 プロモーターにより直接レポーター遺伝子の発現を誘導する場合、レポーター遺伝子の発現量が十分でない可能性があると考え、CRE-loxP システムを用いた発現誘導を行うことにした。また、CRE やレポーター遺伝子の発現が、cmlc2 プロモーターや、遺伝子が挿入されたゲノム上の周辺の領域の影響を受けるのを避けるため、cHS4 インシュレーター配列を配置した。以上の要素を含み、制限酵素 NdeI サイトと CRE リコンビナーゼを配置したベクター(図 2a)、アクチンプロモーターの下流に loxP-STOP カセット(転写停止配列)-loxP と制限酵素 NruI サイトを配置したベクターをまず構築し、それぞれを制限酵素 NdeI、NruI で処理した後に Opn5L1 プロモーター配列とレポーター遺伝子 (WGA-P2A-EGFP) をそれぞれ挿入したプラスミド(図 2 b, d)を調製した。これら

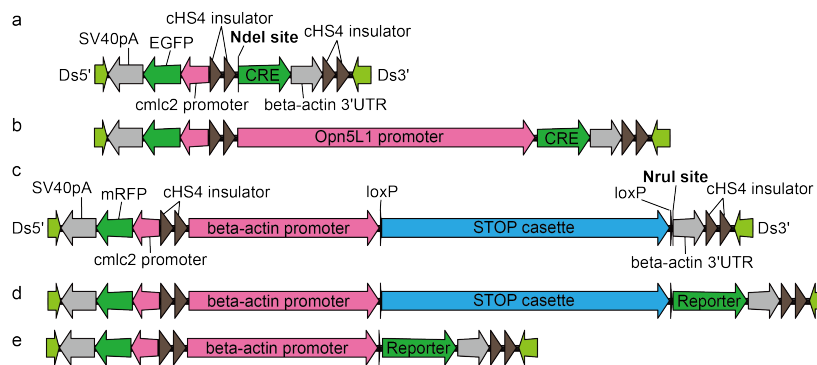


図2 新たに構築した Opn5L1-CRE ベクターと アクチン-LSL-レポーターベクターの設計

両者が組み込まれたメダカにおいては、Opn5L1 発現細胞では CRE によって STOP カセットが除去され、アクチンプロモーターに駆動されてレポーター遺伝子が発現する(図 2e)。一方、それ以外の細胞においては STOP カセットによって転写が停止する。これらのベクターについて構築を完了し、メダカ卵へのマイクロインジェクションを進行中である。

(2)Opn5L1 へのエピトープタグの付加とレポーター遺伝子の導入を CRISPR/Cas9 法を用いたノックインにより同時に行うためのベクター構築

図1に示したコンストラクトによる遺伝子導入がうまく行かなかった段階で、もう一つの選択肢として、レポーター遺伝子の CRISPR/Cas9 による遺伝子のノックインを試みた。メダカにおける CRISPR/Cas9 によるノックインの報告に基づき、BaitD 配列を 2 つ持つベクターに、約 500bp のホモロジーアーム(5' arm, 3' arm)を連結し、それらの間に OLLAS エピトープタグ、P2A 配列、WGA を連結したベクターを構築した。OLLAS tag, P2A, WGA については、Opn5L1 の C 末端にコドンのフレームが合うように設計した。SpCas9 タンパク質と sgRNA を別途調製

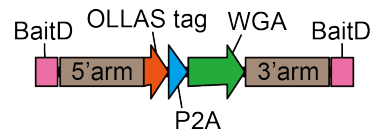


図3 エピトープタグとレポーター遺伝子を同時にノックインするベクターの設計

し、これらをメダカ卵にインジェクションした後、孵化から約1ヶ月後のメダカについて、尾ビレからゲノムを抽出し、PCRにより遺伝子導入の検証を行った。しかし、遺伝子の導入は確認できなかった。ここで、ホモロジーアームはゲノムの配列と完全に同一の配列を用いているため、このベクターを SpCas9、sgRNA と同時にインジェクションした際にゲノムだけでなく、ベクターの方もホモロジーアーム内で切断されてしまい、相同組み換えの確率が低下している可能性が考えられた。そこで、ベクターのホモロジーアーム内において、sgRNA の標的配列に変異を導入したベクターを新たに構築した。現在これらのメダカ卵へのマイクロインジェクションを進行中である。

### (3) ノックアウトメダカと行動実験のためのシステム構築

Opn5L1b, Opn5L1c についてはノックアウトメダカが作製済みである。また、メダカの行動解析を様々な光環境で自動的に行うための装置を作製した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Keita Sato, Takahiro Yamashita, Hideyo Ohuchi, Atsuko Takeuchi, Hitoshi Gotoh, Katsuhiko Ono, Misao Mizuno, Yasuhisa Mizutani, Sayuri Tomonari, Kazumi Sakai, Yasushi Imamoto, Akimori Wada, Yoshinori Shichida	4. 巻 9
2. 論文標題 Opn5L1 is a retinal receptor that behaves as a reverse and self-regenerating photoreceptor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-03603-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Keita Sato, Takahiro Yamashita, Keiichi Kojima, Kazumi Sakai, Yuki Matsutani, Masataka Yanagawa, Yumiko Yamano, Akimori Wada, Naoyuki Iwabe, Hideyo Ohuchi, Yoshinori Shichida	4. 巻 1
2. 論文標題 Pinopsin evolved as the ancestral dim-light visual opsin in vertebrates	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-018-0164-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato M, Sato K, Habuta M, Fujita H, Bando T, Morizane Y, Shiraga F, Miyaishi S, Ohuchi H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Localization of the ultraviolet-sensor Opn5m and its effect on myopia-related gene expression in the late-embryonic chick eye	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2019.100665	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujiyabu C, Sato K, Utari NML, Ohuchi H, Shichida Y, Yamashita T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Evolutionary history of teleost intron-containing and intron-less rhodopsin genes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 10653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47028-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 佐藤 恵太, 山下 高廣, 大内 淑代, 七田 芳則	4. 巻 59
2. 論文標題 「光受容体」Opn5が示す多様な分子機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 132-136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.132	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計11件(うち招待講演 4件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Keita Sato, Takahiro Yamashita, Hideyo Ohuchi, Atsuko Takeuchi, Hitoshi Gotoh, Katsuhiko Ono, Misao Mizuno, Yasuhisa Mizutani, Sayuri Tomonari, Kasumi Sakai, Yasushi Imamoto, Akimori Wada, Yoshinori Shichida
2. 発表標題 Vertebrate photoreceptor, Opn5L1, is the newcomer of opsin acting as a reverse and self-regenerating photoreceptor
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keita Sato, Yukimi Nishio, Takahiro Yamashita, Yasushi Imamoto, Hideyo Ohuchi, Yoshinori Shichida
2. 発表標題 Functional conversion of molecular property of Opn5 by key amino acid substitution
3. 学会等名 18th International Conference on Retinal Proteins(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤恵太
2. 発表標題 小型魚類における光受容タンパク質Opn3及びそのホモログtntオブシンの組織局在
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤恵太、春木慶洸、山下高廣、七田芳則、大内淑代
2. 発表標題 非視覚性光受容タンパク質Opn5L1の分子組織化学的解析
3. 学会等名 第34回下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤恵太
2. 発表標題 Opn5の分子機構多様性とその応用
3. 学会等名 ISSPワークショップ「レチナルタンパク質の光機能発現の物理と化学」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤恵太
2. 発表標題 Opn5類縁タンパク質の 光遺伝学への応用可能性
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤恵太、菱池政展、大内淑代
2. 発表標題 メダカ下垂体に発現する 光受容タンパク質の分子組織化学的解析
3. 学会等名 第33回下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤恵太、春木慶洸、山下高廣、七田芳則、大内淑代
2. 発表標題 非視覚性光受容タンパク質Opn5L1の分子組織化学的解析
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤恵太
2. 発表標題 Opn5L1, a reverse photoreceptor with light-induced covalent chromophore modification
3. 学会等名 International Symposium on Biophysics of Rhodopsins (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤恵太、Khine Nwe Nwe、大内淑代
2. 発表標題 小型魚類メダカの網膜・脳におけるOpn3/tmtオプシンmRNAの組織局在
3. 学会等名 異分野融合による次世代光生物学研究会
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

暗所視と色覚はどっちが先？ 脊椎動物の視覚進化モデルを修正  
[https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release\\_id569.html](https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id569.html)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----