

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06336

研究課題名（和文）新規光受容タンパク質が発現する脳内光受容器官の新規の生理機能に関する解析

研究課題名（英文）The characterization of the deep brain photoreceptor expressing non-visual opsins.

研究代表者

山下 絵美（川野）（KAWANO-YAMASHITA, Emi）

奈良女子大学・自然科学系・助教

研究者番号：80804583

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：無顎類ヤツメウナギ脳から非視覚オプシンbPPLを単離し、それが発現する新しい脳深部光受容器官を同定した。そこで、培養細胞系を用いた細胞生物学的解析や神経トレーサー実験などの組織学的解析を行い、bPPLを含む細胞群の特徴を調べた結果、bPPLは紫～青色光感受性の光受容タンパク質であり、bPPLが局在する細胞群は、眼に向けて長い軸索を伸ばす遠心性ニューロン（向網膜系ニューロン）で構成されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、動物が受容した光の情報は、眼から脳へ一方向的に伝達されるのではなく、脳から眼に向かう経路が存在することを見出した。このことは、「脳内で受容した光情報を眼で利用する」という新しい光受容機能の可能性を示唆している。脳から眼に情報を送る、いわゆる「向網膜系ニューロン」は、ヤツメウナギからヒトを含む哺乳類までの脊椎動物全般が持っており、脊椎動物に共通するメカニズムだと考えられる。動物にとって重要な生理機能の一つである「視覚」の全容を理解するためにも、脳内光受容と向網膜系ニューロンの関係を理解することは重要である。

研究成果の概要（英文）：We isolated a non-visual opsin, bPPL, from the lamprey brain, and we found a new deep brain photoreceptor expressing bPPL. In this study, we investigated the characteristic of the bPPL-expressing cells with the cell biological analysis using cultured cell and histological analysis such as the retrograde labelling with neural tracer. Heterologous action spectroscopy using the cellular assay showed that bPPL formed a violet to blue-sensitive pigment. Moreover, the bPPL-containing cells had an axon projecting to the retina. These findings suggest that the bPPL-containing cells are sensitive to violet to blue light and transmit the light information to the retina.

研究分野：動物生理学・光生物学

キーワード：ロドプシン 光受容 非視覚 脳深部光受容

1. 研究開始当初の背景

多くの脊椎動物は、眼で捉えた光を物の形や色を認識する「視覚」で利用するのに加え、松果体や脳などの器官で直接捉えた光を生体リズム等の様々な「視覚以外（非視覚）」の生理機能の調節に利用している。動物の光受容は、最初に、視細胞などの光受容細胞に存在する光受容タンパク質が活性化されることでスタートする。一般に、動物は、複数種類の光受容タンパク質遺伝子を持っており、視覚や非視覚の光受容機能を制御している。私たちは、これまで、最も下等な脊椎動物の一つである無顎類ヤツメウナギを用いて、松果体で機能する紫外光受容タンパク質パラピノプシンを同定し、松果体の光受容に関する解析を行ってきた。その過程で、ヤツメウナギの光受容タンパク質の多様性を解析したところ、脳内から新規の光受容タンパク質(オプシン)遺伝子の単離に成功した。オプシン類の分子系統樹を作成すると、この新規オプシンは、パラピノプシンと近縁であるが、全く異なるオプシンとして区別された(図1; 図中では、新規オプシンを、本研究で得られた「青色光感受性」の特徴と合わせて、「bPPL」と記載している。)

さらに、*in situ* ハイブリダイゼーションにより、脳内での発現部位を調べたところ、bPPLは、ヤツメウナギの松果体ではなく、中脳の「シェーバーのM5核」と呼ばれる神経核に発現していた。加えて、緑色光感受性の非視覚オプシンであるP-opsin(鳥類以下の脊椎動物に広く存在するVA/VALオプシンのホモログ)もまた、同じくシェーバーのM5核に発現していた。シェーバーのM5核は、網膜に投射する遠心性神経(「向網膜系ニューロン」と呼ばれる細胞群)で構成されるという大変特徴的な神経核であり、脳から眼に向けて情報を送ると考えられている。つまり、bPPLとP-opsinにより脳深部で受容した光情報が眼に伝達されるという、これまでに知られていない光情報の伝達経路が存在する可能性が示唆された。すなわち、「脳深部の光受容が網膜機能の調節に関わるのか?」という新しい非視覚機能の問題に直面することとなった。

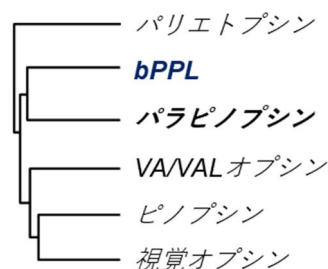


図1. 脊椎動物の非視覚オプシン
パラピノプシンに近縁な非視覚オプシンとしてbPPLを単離した。図はオプシン類の分子系統樹を模式図を示す。

2. 研究の目的

本研究では、無顎類ヤツメウナギ脳から単離された新規の非視覚オプシン bPPL と緑色光感受性オプシンの P-opsin に着目し、それら 2 種類のオプシンが発現する新しい脳深部光受容器官が、どのような光情報を受容して、どの神経細胞に伝達するのかを調べることで、「脳内で受容した光情報を眼で利用する」という新しい光受容機能の可能性について検討することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、bPPL の波長感受性や bPPL と共役するシグナル伝達分子の特定などといったオプシン分子の性質について、培養細胞系を用いた細胞生物学的解析を行い検討した。また、bPPL と P-opsin が発現する脳内の光受容細胞を中心とした神経回路を調べるために、脳深部の神経核をターゲットとした神経トレーサー実験の手法を再考し、免疫組織化学法などと組み合わせた組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 新規非視覚オプシン bPPL の分子特性

まず、bPPL の光感受性について、G タンパク質を介したシグナル伝達をモニターできる GloSensor cAMP Assay により検討した。これは、cAMP を結合すると発光するバイオセンサー (GloSensor™) により、細胞内の cAMP 量の増加・減少を測定する方法である。そこで、培養細胞系を用いて、bPPL タンパク質を強制発現させ、光照射を行うことで、bPPL が光依存的に細胞内の cAMP 量を変動させるのかを検討し、bPPL が実際に光受容タンパク質として機能できるのかを調べた。その結果、bPPL は、光照射で細胞内 cAMP 量を減少させるという、明瞭な光反応を示した(図2)。つまり、bPPL は、光照射に伴い、細胞内の Gi 型 G タンパク質を介

したシグナル伝達系を駆動して、cAMP量を減少させることが明らかになった。次に、この測定法を利用して、bPPL発現細胞の波長感受性について解析したところ、410nm～470nmの光に高い細胞応答を示し、紫～青色光感受性の光受容タンパク質であることがわかった。

ヤツメウナギ P-opsin については、分光学的解析に成功し、吸収スペクトルから、500nm に吸収極大を示す緑色光受容タンパク質であることが示された。また、P-opsin についても同様に GloSensor cAMP Assay による解析を行ったところ、光照射に伴い、細胞内の Gi 型 G タンパク質を介したシグナル伝達系を駆動して、cAMP 量を減少させるという、bPPL と同様の光反応を示すことが明らかとなった。これらの結果を考えると、ヤツメウナギ中脳のシェーバーの M5 核では、bPPL と P-opsin を発現する細胞が、紫～緑色光に反応し、Gi 型の G タンパク質を介するシグナル伝達系を駆動して、光応答をすと推測された。

これらの結果については、学術誌に報告した (Kawano-Yamashita et al., 2020, Sci. Rep.)

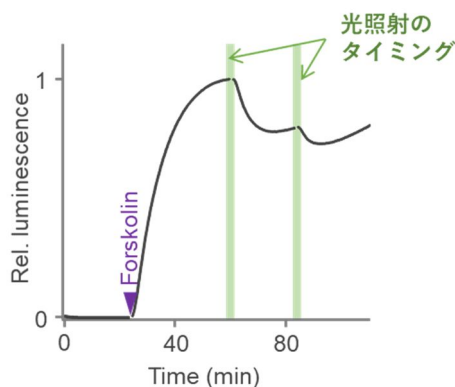


図2. bPPLの光依存的な細胞応答

培養細胞系で発現させたヤツメウナギbPPLは、光依存的に細胞内のcAMP量を減少させた。図は、GloSensor™ cAMP Assayにより、細胞内cAMP量の変動を発光量として示したもの。(あらかじめフォロスコリンを添加し、培養細胞内のアデニレートサイクเลสを活性化させることで、細胞内のcAMP濃度を上昇させ、発光量を増加させた。)

(2) bPPL を発現する新規脳深部光受容細胞の神経投射

視神経の切断部から神経トレーサー物質を取り込ませ、網膜に投射する細胞を逆行性標識すると、シェーバーの M5 核における網膜に投射する遠心性神経(向網膜系ニューロン)が可視化できる(図3)。そこで、神経トレーサー標識と特異的抗体を用いた免疫組織化学的解析を行ったところ、bPPL や P-opsin は、シェーバーの M5 核の向網膜系ニューロンや近傍の小型神経細胞に局在した (Kawano-Yamashita et al., 2020, Sci. Rep.)

次に、シェーバーの M5 核において、脳深部光受容器官を構成する細胞の組織学的特徴について、詳細に検討した。シェーバーの M5 核に存在する向網膜系ニューロンの細胞体は、第三脳室をはさんで左右対称に存在するが、その神経投射は左右非対称であることが明らかになり、生理機能を考える上で有用な知見が得られた。

さらに、bPPL と P-opsin を発現する脳内光受容細胞を中心とした神経ネットワークの解析を目指して、脳深部をターゲットとした神経トレーサー実験の手法を再考した。まず、bPPL を発現するシェーバーの M5 核の光受容細胞に対して、ガラス管キャピラリーを刺入して、局所的に神経トレーサー物質を取り込ませ、細胞の神経繊維を標識する手法を確立した。次に、この神経トレーサー実験系を用いて、ヤツメウナギ脳深部の bPPL 発現細胞に対する順行性標識を行い、光受容細胞の軸索末端部までを可視化し、免疫組織化学法などと組み合わせた組織学的解析を行った。その結果、これらの細胞群が投射する網膜層を特定することができ、神経投射する網膜部位の特徴についても分かった。

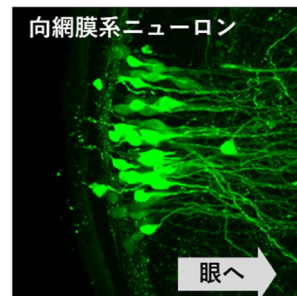


図3. シェーバーのM5核の向網膜系ニューロン

(3) ヤツメウナギの成長過程における網膜視細胞の発達

上述のように、本研究でターゲットとする脳深部光受容器官は、眼の機能(視覚を含む)に影響を及ぼす可能性が考えられる。一方で、ヤツメウナギは、数年間の幼生期を経て、成体へと変態するが、その際に、眼の外部形態が大きく変化することが知られている。つまり、幼生期と成体期では、眼の構造と機能が全く異なると考えられるが、幼生期の眼については、不明な点が多く残っている。そこで、本研究では、日本産ヤツメウナギ(スナヤツメ)を用いて、その成長過程における眼の発達についても免疫組織化学的に検討した。その結果、幼生から成体までの全ての成長段階において、2種類の視細胞(ロドプシン細胞、赤オプシン細胞)が存在するが、幼生と成体では、細胞数の比率が異なることが示された。過去の研究では、幼生期の赤オプシン細胞の存在は明確に示されていないので、本研究で得られた結果は、幼生の眼でも2種類の吸収波長と光感度の異なる視細胞が機能し、眼の光受容機能を支えることを示す新しい知見であった。この結果については、学術誌に報告した (Hoque et al., 2021, Zool. Sci.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shen Baoguo, Wada Seiji, Nishioka Haruka, Nagata Takashi, Kawano-Yamashita Emi, Koyanagi Mitsumasa, Terakita Akihisa	4. 巻 7
2. 論文標題 Functional identification of an opsin kinase underlying inactivation of the pineal bistable opsin parainopsin in zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-021-00171-1	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 Kawano-Yamashita Emi, Koyanagi Mitsumasa, Wada Seiji, Saito Tomoka, Sugihara Tomohiro, Tamotsu Satoshi, Terakita Akihisa	4. 巻 10
2. 論文標題 The non-visual opsins expressed in deep brain neurons projecting to the retina in lampreys	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66679-2	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 Wada Seiji, Shen Baoguo, Kawano-Yamashita Emi, Nagata Takashi, Hibi Masahiko, Tamotsu Satoshi, Koyanagi Mitsumasa, Terakita Akihisa	4. 巻 115
2. 論文標題 Color opponency with a single kind of bistable opsin in the zebrafish pineal organ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 11310 ~ 11315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1802592115	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 Hoque Ferdousi Arjana, Kawano-Yamashita Emi, Miyamoto Yuka, Tamotsu Satoshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Immunohistochemical Characterization of the Development of Long Photoreceptor Cells in the Lamprey Retina	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs200151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Emi Kawano-Yamashita, Nanaho Yura, Mitsumasa Koyanagi, Seiji Wada, Akihisa Terakita, Satoshi Tamotsu
2. 発表標題 Histological investigation of deep brain photoreceptors in the larval and adult lampreys
3. 学会等名 日本比較生理生化学会42回山形大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下(川野)絵美
2. 発表標題 無顎類ヤツメウナギの非視覚オプシンが発現する脳内光受容器官
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下（川野）絵美、由良南々帆、小柳光正、和田清二、寺北明久、保智己
2. 発表標題 無顎類ヤツメウナギの脳深部に存在する新規光受容器官の非視覚オプシンに着目した組織学的解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沈宝国、和田清二、永田崇、山下（川野）絵美、小柳光正、寺北明久
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ松果体における波長検出に関わる光受容タンパク質パラピノプシンの不活性化機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井美咲、熊田侑起、山下(川野)絵美、佐藤宏明、保智己
2. 発表標題 ヤツメウナギ幼生に見られるphoto-kinesisへの松果体の役割
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下(川野)絵美
2. 発表標題 無顎類ヤツメウナギの非視覚オプシンに着目した新規脳深部光受容器官の組織学的解析
3. 学会等名 異分野融合による次世代光生物学(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下(川野)絵美、保智己、小柳光正、和田清二、寺北明久
2. 発表標題 幼生期及び成体期のヤツメウナギにおける非視覚オプシンが発現する脳深部光受容器官の組織学的解析
3. 学会等名 第89回日本動物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawano-Yamashita Emi, Tamotsu Satoshi, Koyanagi Mitsumasa, Wada Seiji, Terakita Akihisa
2. 発表標題 Histochemical investigation of non-visual opsin-expressing photoreceptor cells in the larval and adult lamprey brains
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第40回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wada Seiji、Shen Baoguo、Kawano-Yamashita Emi、Nagata Takashi、Hibi Masahiko、Tamotsu Satoshi、Koyanagi Mitsumasa、Terakita Akihisa
2. 発表標題 Investigation of a mechanism for color opponency in the zebrafish pineal organ under natural light conditions
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第40回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shen Baoguo、Wada Seiji、Kawano-Yamashita Emi、Koyanagi Mitsumasa、Terakita Akihisa
2. 発表標題 Comparative investigation of light responses of pineal photoreceptor cells containing different types of opsins with transgenic zebrafish
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第40回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------