

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16971

研究課題名(和文)メラノプシン光応答特性から迫る非イメージ形成視覚の光答機構

研究課題名(英文)Illuminating melanopsin mediated photo-responses

研究代表者

松山・オジヨス 武(Matsuyama Hoyos, Takesi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・客員研究員

研究者番号：50756054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々の眼は視力以外にもさまざまな形で光入力を利用している。例えば、網膜に当たる光を調節するため、明るいところでは瞳孔を小さく、暗いところでは瞳孔を大きく調整している。また動物の睡眠・活動サイクルもこのような非視覚機能の光入力によって調整されていることが知られている。このような視覚とは別の光生理機能を非視覚機能、あるいは非イメージ形成機能として知られている。本研究ではさまざまな光環境下でマウスの行動リズムをモニターすることで非視覚機能の応答特性を検討した。その結果、非視覚機能は視覚機能とは異なる非視覚応答独自の特徴があ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

現代社会は室内外照明やテレビ、PC、タブレットや携帯などのモバイルデバイスから光刺激を絶えず受け取っており、光による意図せざる副作用も懸念されている。本研究では視覚以外の光応答機能を担うメラノプシンの応答特性に注目した。本研究では非視覚機能の応答特性が視覚機能のものとは異なることを示すだけでなく、光環境が行動リズムに大きく影響することを確認した。このように非イメージ形成機能の理解を深めることで、現代社会の人工的で不規則な光環境の悪影響を軽減することができると考えている。

研究成果の概要(英文)：Our eyes utilize light information in diverse ways. For example, the diameter of our pupil changes according to the lighting conditions in order to adjust the amount of light reaching the retina. Our sleep/wake cycle is also influenced by light input. These types of physiological responses, different from the so called visual-functions, are known as non-visual (or non-image-forming) functions. In this study, we monitored the activity of mouse under different light conditions to investigate the light response properties of non-visual functions. My results indicate that non-visual-functions elicit a distinctive light responsiveness, different from the traditional visual light responses.

研究分野：生化学、動物行動、光生理

キーワード：メラノプシン 非視覚機能 概日リズム 非イメージ形成

## 1. 研究開始当初の背景

太陽光は地球上で生活するすべての生物にとって昼夜リズムや季節変動を生み出す最も重要なペースメーカーであり、そのためほとんどの生物が光受容に特化した器官をもっている。研究開始当初、網膜の光受容機能には明暗、色覚、形態、運動など意識に上る従来の「イメージ形成視覚 (IF:image forming vision)」の他に、意識に上らないいわゆる「非イメージ形成視覚」(NIF:non image forming vision)が注目されていた。2000年代、網膜神経節細胞の一部にメラノプシンが同定されると、「非イメージ形成視覚」の研究の幕開けとなった。非イメージ形成視覚機能を担う光受容体「メラノプシン」が見つかったことによってそれまで注目されていなかった光の生理現象が次々と明らかになっていった。

非イメージ形成視覚には例えば、体内時計が昼夜の光リズムからずれた時に光によって調節する概日リズムの光同調、眼に入ってくる光を調節するために瞳孔の大きさを変える瞳孔光反射、光によってホルモンの分泌を抑制するなど、イメージ形成の視覚以外のさまざまな光受容機能が報告されていた。上記の他にも、光は概日リズムとは独立して睡眠や他の生理機能の制御にも、マウスでは変則的な時間に光刺激をするとその学習能力や気分(ストレス)に影響することが報告されていた。これらの光生理現象はイメージ形成の視覚同様に眼で制御されているが、視覚機能を担う従来の視細胞とは別の光感受性細胞が担っていることが研究開始当初の研究で示されていた。眼から脳への出力ニューロンである網膜神経節細胞の一部がメラノプシンという光感受性タンパク質を発現することによって内在性の光感受性を持ちこれらの非イメージ形成視覚生理機能を担っている。ただしイメージ形成視覚・非イメージ形成視覚は独立に機能しているのではなく、非イメージ形成視覚を担うメラノプシン細胞は視細胞からの光応答も受け取ることができるため、網膜内層のメラノプシン細胞と外層の視細胞は相補的に光量感知を担っており、ipRGC(メラノプシン細胞)を選択的に無くすと光同調や瞳孔反射など多くの非イメージ形成視覚が完全に失われることが報告されていた。したがって非イメージ形成視覚機能の解明には従来の視細胞およびメラノプシン細胞両方の光反応を考慮しなければならないと考えた。

このような数々の非視覚機能の応答の中でも行動リズムの調整に注目した。霊長類は昼行性から夜行性そして夜行性から夜行性へ複数回生活リズムを反転したと考えられている。またハムスターは環境によって柔軟に昼夜リズムが反転することが知られていて、他にも視床下部損傷のラットは昼行性になるなど昼・夜行性のリズムが反転する例が幾つか報告されていた。メラノプシン KO マウスの中には( ~ 10% ) 昼行性の表現系を示す個体があるという興味深い報告もあり、網膜からの入力昼・夜行性の表現系など行動リズムに大きく影響すると示唆されていた。

このようにさまざまな興味深い新規の非視覚機能の解析が進みメラノプシンの関与が強く示唆されていた。しかし一方で、メラノプシン自体の特性解析が遅れておりメラノプシンの応答特性を加味した非視覚機能の解析は少なく、非視覚機能のメカニズムに言及するボトルネックとなっていた。これまでの生化学的な検討などによりメラノプシンはタンパクレベルで独自の波長応答特性を持つことを示してした。メラノプシンは独特の波長感度を持つだけでなく、光産物が動的に変化するいわゆる「光定常状態」が特徴である。また行動や細胞レベルの知見よりメラノプシンの光反応は網膜外層の視細胞に比べて強度の強い定常光での寄与が重要だと考えられていた。したがってメラノプシンの寄与が増える強い光条件下では光定常状態の光反応が生理的に重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

上記で記したように眼は視覚以外にも概日リズム光同調など様々な生理応答のために光情報を用いており、このようなこれまで知られていなかった非視覚光受容機能が注目されている。このような光信号はメラノプシン細胞と呼ばれる視覚を担うのとは別の神経節細胞によって伝えられ、視覚系からの光入力に加え独自に光反応する事もできる。この光反応を担う光受容タンパク質は視覚系で機能するものと類似するオプシタンパク質であるが、独自の光反応特性を持っている。本研究ではこのメラノプシン細胞の光反応特性を用いて非視覚応答へ介入できるか検証した。野生型のマウスやメラノプシン KO マウスにおいてその行動リズムを夜行性から昼行性へ変えることができるという報告が幾つかあったため行動リズムにおいてメラノプシンの光反応特性を持ってマウスの行動リズムを変化させることができないか検討した。マウスの行動リズム実験について先報では光強度のみが考慮されており、その波長分布は加味されていなかった。そのためまず先報の再現性を確認すると同時にどのような波長応答特性があるか検討することを目的とした。また2つ目の目的としてはメラノプシンの反応がこの行動リズムの変化にどう影響しているのか検討した。

現代社会は室内外照明やテレビ、PC、タブレットや携帯などのモバイルデバイスから光刺激を絶えず受け取っており、光による意図せざる副作用も懸念されている。光の波長や強度などを操作することによって非視覚応答を制御することができれば、そのような副作用を軽減するような光環境への応用ができると考えている。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス行動リズム

これまで概日リズムやその他の非イメージ形成視覚の光生理応答に注目した研究は主に光の有無のみに注目している。光強度を変化させた報告もあるが、多くの場合は視感度で表されるイメージ形成視覚の光量感度のみが考慮されており、非イメージ形成視覚の波長感度が考慮されていない。また波長特性を考慮した研究でもメラノプシンの反応特性(光定常状態での反応)が反映されていない。本研究では光の放射量および波長特性を操作することによってイメージ形成視覚と非イメージ形成視覚の分離を試みた。また時間経過とともにイメージ形成視覚からの入力が低下する網膜変性モデルマウスを用いることで光強度、波長特性のみでなく非イメージ形成視覚の相対的な光入力の効果を検証した。この3つのパラメータを変化させることで非イメージ形成視覚機能の操作を試みた。特に光環境の操作による昼・夜行性リズムの変化に注目した。

野生型マウスにおいて、暗所条件では昼夜反転が起こるといった既報がある。しかしどのような機構でこのようなシフトが起こるか明かされていない。また同様な表現系がメラノプシン KO マウスの一部でも報告されており、メラノプシンの関与が示唆されている。しかし既報の光強度はルクスで表記されており、昼・夜行性反転にどの波長領域が有効なのか明らかではない。したがって、先ず既報の報告を再現した上で、その波長特異性を解析した。具体的にはメラノプシン/S 錐体視物質を主にターゲットした青色光刺激とロドプシン/M 錐体視物質をターゲットしたオレンジ/赤色光を用いて昼夜リズムの変化を解析した。

また同様な異なる波長、光強度での行動リズムの変化を網膜変性モデルマウス (rd1) でも解析した。網膜変性マウスは視覚を担う視細胞が徐々に変性し最終的には外層がなくなる。rd1 網膜変性モデルでは外層からの光入力が徐々に減っていくことが予想され、イメージ形成視覚/非イメージ形成視覚の相対的な入力の比が昼・夜行性行動のシフトに関わるのか検証することができると考えた。またメラノプシン KO マウスを用いて上記と同様な解析を行い、視細胞由来の光入力がある状態がどのように行動リズムへ影響するのか検討した。

#### (2) メラノプシン反応のモデリング

本研究の大きな特徴はメラノプシンの独自の光反応様式を加味したことである。これまでメラノプシンの反応は 480nm 付近に応答ピークを持つ単純なモデルが採用されている。メラノプシンは暗順応状態では 467nm (申請者生化学データ) にピークを持つが、メラノプシンは頭足類の視物質に代表されるような光定常状態が特徴である。またメラノプシンの光反応は網膜外層の視細胞に比べて強度の強い定常光での寄与が重要だと考えられている。したがって光定常状態の光反応が生理的に重要であると考えられる。

さまざまな光条件下におけるメラノプシンの挙動を予測するためこれまでの生化学的な知見および上記の実験結果よりメラノプシンの反応モデルを構築する。このことにより暗順応状態からの反応だけでなく自然で見られるような異なる波長分布や強度におけるメラノプシンの光反応を予測しさまざまな光環境がどのように非視覚機能へ影響するか検討する。

### 4. 研究成果

#### マウスの行動リズム

野生型マウスの行動モニター実験により既報で報告されているような昼夜反転するフェノタイプの再現を試みた。この現象が見られる光強度条件の領域は非常に限定されており、実施したほとんどの光条件では目的のフェノタイプを得ることができなかった。また行動リズムの反転を観察するまでには当初の予想よりも長時間の測定が必要であることが明らかとなった。しかし測定条件を最適化することで野生型の昼夜反転フェノタイプを再現することに成功した。

また野生型マウス、網膜変性マウス、KO マウスをさまざまな光条件下で行動リズムを測定することでストレイン、波長強度、波長特性による変化いくつか特定できた (図 1-3 に幾つかの典型例のアクトグラフを示す)。しかし1測定が想定よりも時間を要することに加え新型コロナウイルスの影響で動物実験が制限・中断されたため予定していたすべての条件で解析に必要な分量のデータを取得することができなかった。特にイメージ形成視覚/非イメージ形成視覚の

相対的な入力の比が昼・夜行性行動のシフトに関わるのかについてはデータ量が不十分となり追加の実験が必要である。

図1：通常のマウスのフェノタイプ（夜行性）。黄色の領域は光が点灯している時間を示す。

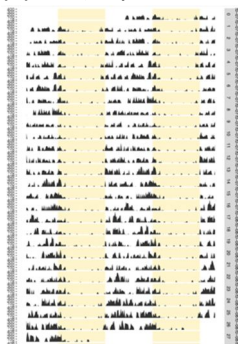


図2：半夜行性・半昼行性のフェノタイプ（あるいは遷移状態の行動リズム）

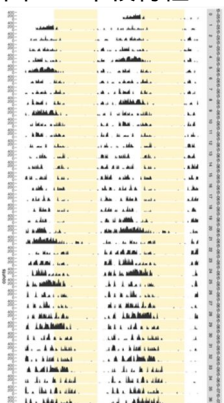
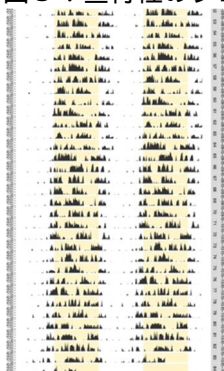


図3：昼行性のフェノタイプ



### メラノプシン反応のモデリングおよび既報との整合性

非視覚機能の光応答特性を解析するためメラノプシンの光反応の解析およびその活性特性を解析し、特定の波長分布の光環境でのメラノプシンの活性のモデリングを行なった。定常光での光反応産物の相対比だけでなく反応キネティックスのモデリングなども行なった。その結果、限定的な光条件下ではメラノプシン反応を青色シングルピークの光反応として説明できるが、自然光や電灯の複雑な波長分布や強度、照射時間を考慮するには新たなモデルが必要であることが明らかとなった。新しく確立したメラノプシンの反応モデルによってさまざまな状態における多様な光状態に対する応答を予測することが可能となった。上記の行動リズムの実験条件もこのモデルによって最適化することができた。

メラノプシンの応答特性はこれまでも幾つか報告があり、上記のメラノプシン反応モデルが既報データと整合性があるか検討するため既報データを用いたメタアナリシス(meta-analysis)を実施した。その結果、個々の論文からは観測されないが、これまでの知見をまとめることで既報データには単純なモデルでは説明されない挙動があることが判明した。メラノプシンの新たな反応モデルは既報のデータによく一致するだけでなく、このメタアナリシスによって新たに明らかになった現象を説明することもできる。上記の行動リズムおよびメラノプシン反応のモ

デリングによってこれまで既報で報告されている矛盾していると考えられていた結果を説明することができるようになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takesi Matsuyama
2. 発表標題 Reconciling melanopsin tristability with action spectra
3. 学会等名 Institut de la vision Paris, 10 years of vision research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takesi Matsuyama
2. 発表標題 Melanopsin tristability for robust and sustained photoreception under various light conditions
3. 学会等名 Melanopsin tristability for robust and sustained photoreception under various light conditions (国際学会)
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
---------	---------