

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03266

研究課題名(和文) 昼行性生物と夜行性生物における概日光受容体メラノプシンの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the circadian photoreceptor melanopsin in diurnal and nocturnal species

研究代表者

羽鳥 恵 (Hatori, Megumi)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：約一日周期で自律的に発振する体内時計である概日時計は、その名が示す通り正確に24時間ではなく24時間前後を周期としており、恒常条件下では日々のずれが生じる。そこで、光などの外界からの刺激を利用して時刻合わせを行う。時刻調節には、青色波長光を最も感度良く感じるGタンパク質共役型受容体メラノプシンが重要である。遺伝子破壊マウスを用いた研究は進んだものの、夜行性のマウスだけではなく昼行性生物などでの理解も乗り越えるべき壁である。今回、新規化合物開発に挑戦し、阻害効果がより強い阻害剤群や応答速度を変化させる化合物群など様々な特性を持つ化合物を新規に得ることに成功した。また、新規機能を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メラノプシンに作用する低分子化合物の開発に取り組み、阻害剤オプシナミドを世界で初めて、そして現時点で唯一、報告した。今回新たに取り組んでいる新規化合物群とあわせ、薬理的な調節は確立されたモデル動物以外でのメラノプシンの機能理解という目的においても強力であり、メラノプシンの新規機能発見につなげることが可能である。夜寝る直前のスマートフォン使用などで問題とされるブルーライト障害にメラノプシン関わっている。化合物は片頭痛や鬱などメラノプシン関連疾患の改善薬としてのポテンシャルも持ち、学術的だけではなく広く社会に意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Melanopsin, expressed in a subset of retinal ganglion cells, mediates behavioral adaptation to ambient light and other non-image-forming photic responses. This has raised the possibility that pharmacological manipulation of melanopsin can modulate several central nervous system responses, including photophobia, sleep, circadian rhythms and neuroendocrine function. The discovery of melanopsin antagonist Opsinamide (Nat Chem Biol 2013) raised the prospect of therapeutic control of the melanopsin phototransduction system to regulate light-dependent and circadian clock-controlled behaviors and remediate pathological conditions both in nocturnal and diurnal species. In this study, novel compounds were developed. Previously unknown new in vivo functions of melanopsin were also discovered.

研究分野：動物生理

キーワード：概日時計 光応答 環境応答 非視覚応答 メラノプシン

## 1. 研究開始当初の背景

約一日周期で自律的に発振する体内時計である概日時計は、その名が示す通り正確に 24 時間ではなく 24 時間前後を周期としており、恒常条件下では日々のずれが生じる。概日時計は外界からの刺激、特に光と食事という 2 大因子を巧みに利用して時刻合わせを行う。外界からの刺激が体内で統合されることにより生体として概日時計の機能調節を行っている。光入力に関しては、480 nm 付近のブルーライトを最も感度良く感じる G タンパク質共役型受容体メラノプシン (別名 OPN4) が、概日時計の時刻調節に必須の分子である。

目の働きは桿体・錐体が担う視覚応答だけではない。概日時計の時刻調節や瞳孔収縮など、日常生活では意識する機会が少ないが重要な視覚以外の光応答は、目が光を感受して、その情報が脳へ伝えられた結果として引き起こされる。つまり、光を感じる部位は目であり、スタート地点である目での情報処理機構の理解は、アウトプットである全身の恒常性や体調に与える影響を理解する上で必須である。メラノプシンは、ごく一部の網膜神経節細胞に発現している。この細胞こそが非視覚応答に必須であり、視覚応答を担う光受容体である桿体と錐体に次ぐ、第三の光受容細胞である (図 1)。

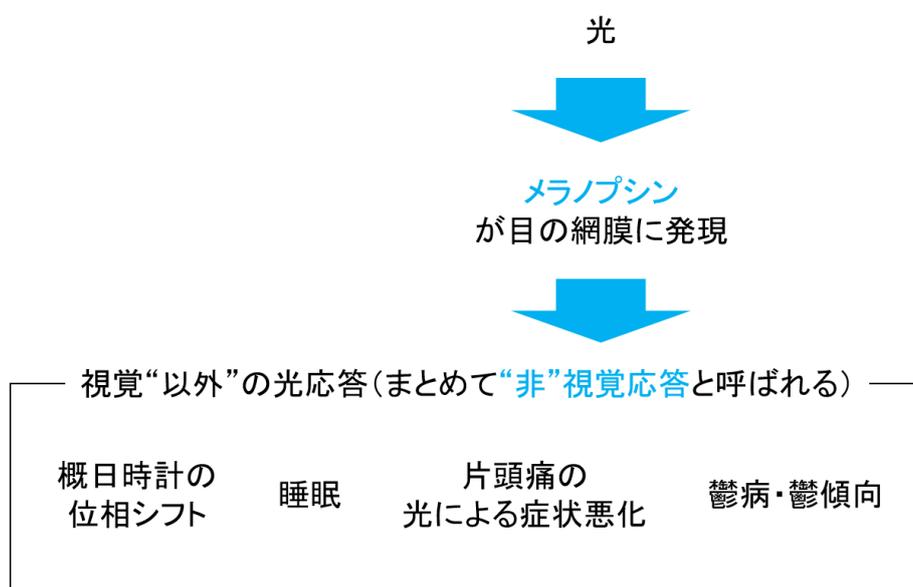


図 1 光受容体メラノプシンと非視覚応答  
桿体・錐体の主な役割は視覚応答であり、メラノプシン細胞は非視覚応答に必要不可欠である。

メラノプシン遺伝子破壊マウスを用いた研究は進んだものの、桿体や錐体のオプシンと比較しての分子のユニークな性質に関しては未だに全貌の解明にはほど遠い。夜行性のマウスだけではなく昼行性生物などでの理解も、分野が今後発展するにあたり乗り越えるべき壁である。特異性の高い薬理的な調節は、マウスなどの確立されたモデル動物以外でのメラノプシンの機能理解という目的においても強力なツールとなる。さらには、先天的ではなく任意に調節できるという薬理的な強みを生かして生体でのメラノプシンの新規機能発見につなげ、将来的には片頭痛や鬱などメラノプシン関連疾患の改善薬としてのポテンシャルを検証できる。

## 2. 研究の目的

これまでに、桿体・錐体の光受容体には作用せずメラノプシンに特異的に作用するアンタゴニストであるオプシナマイドを初めて開発し、マウスの非視覚応答を *in vivo* で阻害することに成功した (*Nat Chem Biol* 2013 図 2)。一方、活性化剤の開発には誰も成功していない。オプシナマイドの生体内半減期はマウスで約 30 分であった。作用時間がより長くかつ活性が強い阻害剤ならびに初の活性化剤を見出し、昼行性生物と夜行性生物におけるメラノプシンの分子理解に役立てることを目的とした。

### 3. 研究の方法

メラノプシンを安定発現させた哺乳類細胞を作製し、カルシウム量の変化を指標としてメラノプシンの活性を定量的に評価する細胞検出系 (図 3) を立ち上げた。化合物を添加し、Fluo4 もしくは Cal520 といった蛍光カルシウム指示薬を用いて、FDSS (浜松ホトニクス株式会社) などのハイスループットスクリーニング適用機器を使用して 384 ウェルプレートで光応答を定量的に解析した。さらにカウンタースクリーニングのため、ヒトの 300 種類以上の G タンパク質共役型受容体に対してアッセイ系を準備した。特に桿体・錐体の光受容体や、メラノプシンと同じく視覚応答以外の機能を担っている光受容体である Opn5 や Opn3 に対する化合物取得も目指した。

### 4. 研究成果

メラノプシンに対する新規化合物開発に挑戦し、阻害効果がより強い阻害剤群や応答速度を変化させる化合物群など様々な特性を持つ化合物を新規に得ることに成功した。以前に開発したメラノプシン阻害剤 (図 2) より活性が遥かに優れている新規骨格の阻害剤を手に入れた。Opsinamides はレチナルを添加すると阻害剤としての効果をすぐに失うが、開発中の新規化合物はその弱点を

### 開発したOpsinamide (Nat Chem Biol 2013にて報告)

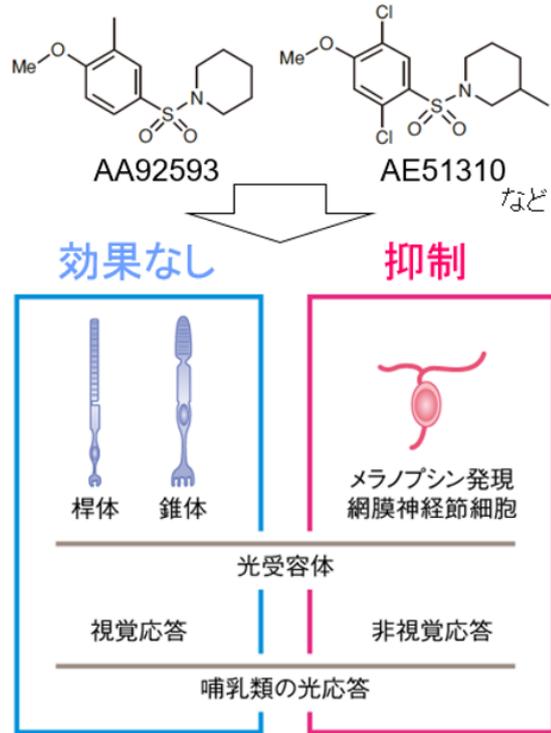


図 2 メラノプシン阻害剤  
桿体と錐体に発現する光受容体および視覚応答 (左) には影響を及ぼさず、メラノプシン発現細胞に由来する非視覚応答 (右) を減弱させる。

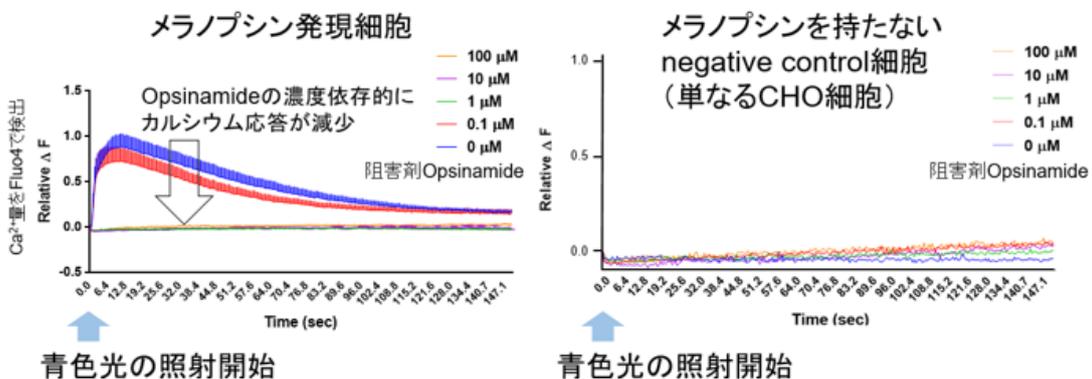


図 3 化合物スクリーニングに用いた細胞アッセイ

マウスのメラノプシンを安定的に発現する哺乳類細胞株を作製した。暗所で培養し、アッセイ時に 480 nm の青色光を照射して細胞内カルシウム量を計測した。オプシナマイドの効果を解析した結果を示す。

克服している。さらには、メラノプシンの応答を阻害すると同時に応答速度を遅延させる阻害剤も手に入れた (図 4)。メラノプシン阻害剤が非視覚応答に与える効果を *in vivo* で検証するため、光刺激に対する瞳孔収縮の測定や片頭痛を緩和するかを検証するマウスの光回避行動アッセイ系を立ち上げた。

また、既知の非視覚応答ではない、メラノプシンの新規機能を発見することができた。

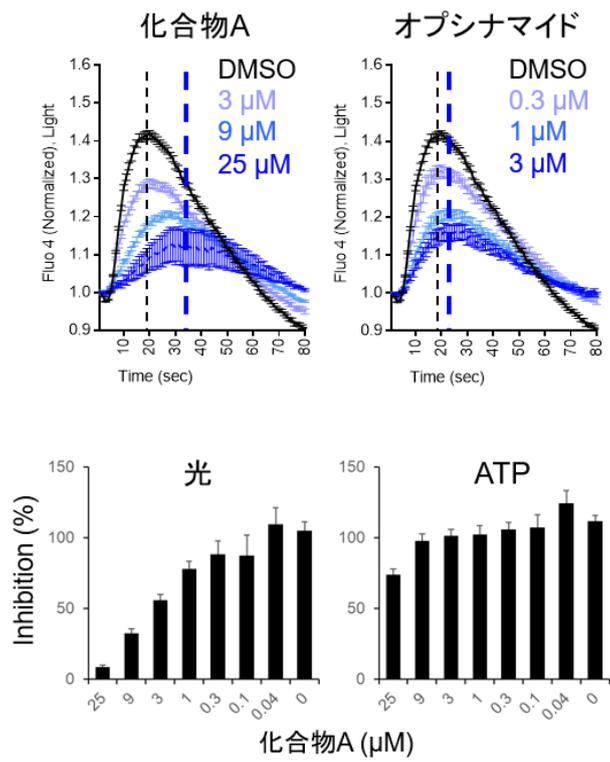


図4 メラノプシンの応答を阻害すると同時に応答速度を遅延させる化合物抑制効果は光刺激に選択的であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 羽鳥 恵	4. 巻 39
2. 論文標題 時間制限摂食と肥満症治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学 増刊号『個人差の理解へ向かう肥満症研究』	6. 最初と最後の頁 214 ~ 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Miller Simon, Son You Lee, Aikawa Yoshiki, Makino Eri, Nagai Yoshiko, Srivastava Ashutosh, Oshima Tsuyoshi, Sugiyama Akiko, Hara Aya, Abe Kazuhiro, Hirata Kunio, Oishi Shinya, Hagihara Shinya, Sato Ayato, Tama Florence, Itami Kenichiro, Kay Steve A., Hatori Megumi, Hirota Tsuyoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Isoform-selective regulation of mammalian cryptochromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 676 ~ 685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-020-0505-1	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 該当する
1. 著者名 Kim Keun-Young, Rios Luis C., Le Hiep, Perez Alex J., Phan Sebastien, Bushong Eric A., Deerinck Thomas J., Liu Yu Hsin, Ellisman Maya A., Lev-Ram Varda, Ju Suyeon, Panda Sneha A., Yoon Sanghee, Hirayama Masatoshi, Mure Ludovic S., Hatori Megumi, Ellisman Mark H., Panda Satchidananda	4. 巻 29
2. 論文標題 Synaptic Specializations of Melanopsin-Retinal Ganglion Cells in Multiple Brain Regions Revealed by Genetic Label for Light and Electron Microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 628 ~ 644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.09.006	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 該当する
1. 著者名 羽鳥 恵	4. 巻 37
2. 論文標題 第三の光受容細胞	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1455-1458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 羽鳥 恵
2. 発表標題 概日リズムの乱れの改善が肥満解消に与える影響
3. 学会等名 第42回日本肥満学会・第39回日本肥満症治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 羽鳥 恵
2. 発表標題 概日光受容体メラノプシンの機能
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 羽鳥 恵
2. 発表標題 Regulation of the energy metabolism by controlling the circadian clock
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 南野 徹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 460
3. 書名 生物の寿命延長	

1. 著者名 堀江 重郎 編、羽鳥 恵 分担執筆	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 152
3. 書名 医学のあゆみBOOKS アンチエイジング診療 23のエッセンス	

1. 著者名 坪田 一男 編、羽鳥 恵 分担執筆	4. 発行年 2019年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 192
3. 書名 診療で役立つ！ 近視進行予防のサイエンス	

〔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
---------	---------