

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16085

研究課題名(和文) 光受容分子OPN4の活性化メカニズムの解析およびその生理的意義の解明

研究課題名(英文) Activation mechanism of photoreceptor protein OPN4 and its physiological meaning

研究代表者

木股 直規 (Kimata, Naoki)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：40822929

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)：メラノプシンはロドプシン様の光受容体であり、哺乳類では視覚以外の光生理応答に寄与している。本研究では、メラノプシンの分子特性が生理応答に与える影響の解明を目指した。まず、ロドプシンの研究から、活性化効率またはGタンパク質の選択性に重要であると考えられたアミノ酸残基について変異体解析を行った結果、いずれの変異体も当初の予想とは異なる光応答を示した。これは、メラノプシンがロドプシンとは異なる活性化機構を持つことを意味している。また、変異体の機能が生理機能に与える影響を検証するため、マウスのメラノプシン発現細胞に、組換えメラノプシンを発現させ、機能を評価する実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果の学術的意義として、光受容体の分子としての機能が個体の生理機能と関連している可能性を見出した点にある。従来、メラノプシンとロドプシンは活性化メカニズムが類似していると考えられていたが、本成果によって生物は生理機能に応じて活性化メカニズムの異なる光受容体を使い分けていることが示唆された。また、組換えメラノプシンを生体に発現・機能させた成果は、将来的にはメラノプシン由来の体の不調、例えば季節性情動障害などの対処法の発見につながる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Melanopsin is a rhodopsin-like photoreceptor protein which regulates non-image forming (NIF) functions in mammals. The purpose of this project is to elucidate importance of the molecular properties of melanopsin for regulation of the NIF functions. First, I analyzed some mutants of melanopsin which are expected to change activation efficiency or specificity of G protein activation, respectively. The results were that these mutants showed different photoresponses from originally predicted, which means that melanopsin does not have the same activation mechanism as those of rhodopsin. In addition, to evaluate the functions of molecular properties of melanopsin on NIF responses in vivo, I generated the mice expressing recombinant melanopsin instead of native one. These mice showed similar NIF response to wildtype mice, meaning that experiment system for testing the effect of melanopsin molecular properties on the physiological NIF functions is established.

研究分野：光生物学

キーワード：メラノプシン 非視覚光応答 GPCR

1. 研究開始当初の背景

多くの脊椎動物は光を受容して生活している。その中でも、特にロドプシンをはじめとする光受容 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であるオプシン類が、多くの視覚および非視覚光機能を制御している。近年、哺乳類の網膜で視細胞に加えて一部の神経節細胞が光感受性を持つことが発見され、現在これらの神経節細胞は光感受性神経節細胞 (ipRGC) と呼ばれている。ipRGC にはオプシン類の一種であるメラノプシンが発現している。メラノプシンは分子系統的に脊椎動物よりも無脊椎動物の視物質と近縁であり、実際に光反応や活性化する細胞シグナル伝達系も無脊椎動物の視物質と類似していることが知られていた。しかし、メラノプシンがなぜロドプシンと異なる分子性質を持つのかのアミノ酸残基レベルでのメカニズム、およびメラノプシンの持つ性質が ipRGC の機能に与える影響については明らかになっていなかった。また、私が所属する研究室では、マウスのメラノプシンがこれまで知られていた Gq 活性化によるシグナル伝達系に加えて、cAMP を介したシグナル伝達系を活性化することを見出したが、その生理的な意義は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、メラノプシンの分子機能、特にロドプシンとの違いを生み出すことに重要なアミノ酸残基を、変異体解析を用いて明らかにすることを目的とする。さらに、メラノプシンの分子性質の ipRGC の機能制御における重要性を解明することも目指す。以上をふまえて、ipRGC による非視覚光応答の制御にメラノプシンが用いられている生理的な意義を追求する。

3. 研究の方法

メラノプシンの各アミノ酸残基が分子機能に与える影響について、培養細胞を用いて評価する。具体的には、C 末端部分に赤色蛍光タンパク質である mCherry を融合した野生型および変異型メラノプシンを、培養細胞にトランスフェクションする。この細胞に青色光を照射し、光依存的なカルシウムイオン濃度または cAMP 濃度の変化を、顕微鏡画像を用いて測定する。この時、mCherry の蛍光を指標としてメラノプシンが発現した細胞を選別することで、より正確な濃度変化を捉えることができる。

ipRGC による非視覚光応答の制御に対するメラノプシンの分子性質の重要性について、マウス個体を用いて検証する。ipRGC 特異的にメラノプシンを発現させるため、メラノプシン遺伝子座に遺伝子組換え酵素 Cre をノックインしたマウス (Opn4^{Cre} マウス) の眼球に、Cre 依存的に組換えメラノプシンを発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターをインジェクションする。これらのマウスの非視覚光応答、具体的には瞳孔反射などを測定・比較することで、メラノプシンの変異または分子性質が生理応答に与える影響を確かめる。

4. 研究成果

(1) マウスメラノプシンの Y224 および Y309 の機能解析

本研究ではまず、マウスメラノプシンのアミノ酸残基のうち、Y224 および Y309 に着目した。これらのアミノ酸残基はオプシン類の間では広く保存されており、かつウシロドプシンでは光活性化における構造変化に重要であることが知られている。しかし、ロドプシンとメラノプシンでは光による活性化システムが異なるため、これらのアミノ酸残基の重要性がロドプシンとは異なる可能性が考えられた。そこで、マウスメラノプシンの Y224F および Y309F 変異体を作製し、光依存的なカルシウムイオン濃度または cAMP 濃度の変化を野生型と比較した。その結果、野生型と比較して Y224F 変異体は光依存的カルシウムイオン濃度の上昇が大きく減弱した。一方で、Y309F 変異体ではカルシウムイオン濃度の上昇が見られたが、野生型とはカルシウムイオン濃度の減少速度が異なっていた。また、Y309F 変異体は光依存的に cAMP 濃度の上昇を引

き起こさなかったが、Y224F 変異体では野生型とほぼ同程度の cAMP 濃度上昇が確認された。これらの結果から、着目したチロシン残基は当初の予想と異なり、シグナル選択性や不活性化に寄与している可能性が考えられる。

(2) マウスメラノプシンのシグナル選択性の変異体作製の試み

次に、本研究ではメラノプシンが Gq 経路に加えて cAMP を介したシグナル伝達系を活性化する点に着目し、これらのシグナル伝達系それぞれの生理機能を比較することを試みた。そのために、マウスメラノプシンの細胞質側第 2 ループ (ICL2) および第 3 ループ (ICL3) の配列を置換することで、Gq または cAMP を介したシグナル伝達系を活性化する Gs の一方を選択的に活性化する変異体を作製することを考えた。置換先の配列として、薬剤依存的に特定のサブタイプの G タンパク質を活性化する人工 GPCR である DREADD を選択した。まず、Gq または Gs を活性化する GqDREADD・GsDREADD のシグナル選択性を培養細胞で検証した結果、それぞれの DREADD は対応するシグナル伝達系を選択的に活性化することが判明した。そこで、ICL2 および ICL3 の配列を GqDREADD または GsDREADD の対応する配列に置換した二種類の変異型マウスメラノプシンを作製し、同様の方法でシグナル選択性を検証した。その結果、当初の予想と異なり二種類の変異型メラノプシンはともに Gq・Gs のいずれも活性化できなかった。その理由として、メラノプシンと DREADD では活性化時におけるループ部分以外の構造変化が異なる可能性が考えられる。GPCR は 7 つの膜貫通ヘリックスがループで結合している構造を持ち、活性化時のヘリックス部分の構造変化は GPCR 間で共通していると考えられている。今回の結果は、ループ部分の配列がヘリックス部分の構造に影響を与えるという、GPCR の構造・機能相関の新たな知見につながるものと考えられる。(1)の結果と合わせて、メラノプシンはロドプシンや DREADD などの GPCR とは異なる活性化メカニズムを持つ可能性が示唆された。

(3) 組換えメラノプシンをマウス ipRGC に発現する系の確立

本研究では、メラノプシンの分子性質がマウス ipRGC の機能に与える影響を解明するため、組換えメラノプシンをマウス ipRGC に発現させる系を確立した。まずは、Opn4^{Cre} マウスの眼球に野生型マウスメラノプシンを発現する AAV を導入することで、ipRGC に組換えメラノプシンが発現し、さらにこのメラノプシンが機能することを確認した。その結果、野生型と比較するとやや弱いものの、AAV を導入したマウスは光依存的な瞳孔反射を示した。この結果から、Opn4^{Cre} マウスの ipRGC に AAV を用いて目的のメラノプシンを発現させ、さらに光受容体として機能させる系が確立したといえる。

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 0件）

1. 発表者名 木股直規、鳥居雅樹、田中翔大、末長祥一、中尾晴美、饗場篤、小島大輔、深田吉孝
2. 発表標題 マウス光感受性網膜神経節細胞における新規光シグナル経路の機能解析
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Kimata, Masaki Torii, Shodai Tanaka, Harumi Nakao, Atsu Aiba, Daisuke Kojima, Yoshitaka Fukada
2. 発表標題 Establishment of transgenic mouse line for functional studies on the signaling pathways in intrinsically photosensitive-retinal ganglion cells
3. 学会等名 第42回日本比較生理生化学会年会
4. 発表年 2020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
---------	---------