

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月15日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570073

研究課題名（和文）体色変化の光制御メカニズム解明に向けた
光受容ニューロンの発生工学的解析研究課題名（英文）Transgenic analyses of retinal photoreceptor neurons
regulating teleost body color change.

研究代表者

小島 大輔 (KOJIMA DAISUKE)

東京大学・大学院理学系研究科・講師

研究者番号：60376530

研究成果の概要（和文）：

硬骨魚類の体色変化は網膜に存在する光センサーによる制御を受ける。本研究では体色変化の光センサーの同定を目指し、ゼブラフィッシュ幼生をモデル動物として体色変化の定量解析系を構築した。幼生の成長過程で体色変化パターンが幼生型から成魚型へと変化するを見出した。幼生網膜の視細胞を選択的に破壊しても正常な体色変化を示すことから、体色変化には視細胞以外の網膜ニューロンが寄与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Light-induced body color change, or background adaptation, in teleosts is regulated by retinal photoreceptor neurons. To identify the photoreceptor neurons, we established a real-time and quantitative monitoring system for body color changes of living larval zebrafish. We found that developing zebrafish exhibit a transition from the embryonic-type to the adult-type pattern of body color change. Selective ablation of retinal rod and cone photoreceptor cells did not affect the profile of larval body color change, suggesting that unidentified non-rod non-cone retinal neurons are responsible for this photoreaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、動物生理・行動

キーワード：体色変化、ゼブラフィッシュ、網膜、オブシン、視細胞、色素胞

1. 研究開始当初の背景

硬骨魚類の体色変化と光受容体 ヒラメやカレイが周囲の色・模様に合わせて自分自身の体色を変化させる「背地適応」は、体色変

化の最も端的な例として古くより知られている。このような光環境に依存した体色変化は、硬骨魚類などの変温脊椎動物に共通して見られる生理的な現象である。硬骨魚類の体

色変化を支配する光センサーが眼球に存在することはほぼ一世紀前から知られており (von Frisch 1911)、視覚の光受容細胞 (視細胞) がその実体であると考えられてきた (図 1)。しかしごく最近になって、ゼブラフィッシュの体色変化に視細胞は必要ないことが示唆された (Muto *et al.* 2005)。具体的には、ゼブラフィッシュの視覚行動を指標にした大規模変異体スクリーニングにおいて、錐体視細胞に異常をもつ変異体が複数同定されたが、いずれも体色変化はほとんど影響を受けなかった。視神経 (網膜から脳へ投射する神経) を欠損した変異体は体色変化に異常を示すことから、体色変化の光制御には視細胞以外の網膜ニューロンが寄与するものと考えられた。興味深いことに、ゼブラフィッシュ網膜の高次ニューロンの一部はロドプシンに類似した光受容分子 (非視覚型オプシン) を発現する (Kojima *et al.* 2000; 2008)。これらの知見を考え合わせると、網膜の高次ニューロンに発現する非視覚型オプシンが体色変化の光受容体の分子実体である可能性が高い。

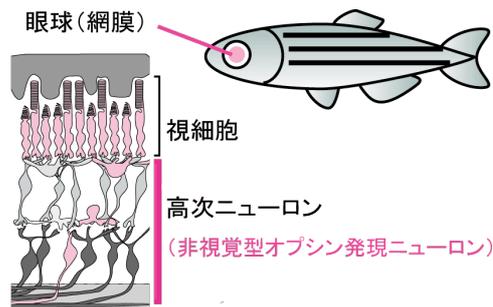


図 1 : 硬骨魚類の体色変化を制御する光受容体

ゼブラフィッシュ 本研究では、体色変化を制御する光受容細胞・光受容分子を同定するために、ゼブラフィッシュをモデル動物として用いた。その理由の一つは上述したように、本計画を着想するに至った 3 つの研究 (Kojima *et al.* 2000; 2008; Muto *et al.* 2005) がゼブラフィッシュを用いて行われたことによる。もう一つの理由は、個体レベルでの遺伝子機能の同定のためにゼブラフィッシュが優れた特徴をいくつも兼ね備えているからである。すなわち、(1) アンチセンスモルフオリノを用いて遺伝子機能をノックダウンできる。(2) 発生工学的な手法によりトランスジェニック系統を樹立することができる。特に近年、トランスポゾン Tol2 を用

いた新しい方法が開発され、これにより極めて高い効率で遺伝子を導入することが可能となった。(3) 幼生期は体が透明であるため、GFP 等を用いて個体レベルで特定細胞を可視化することができる。(4) 近年の大規模な順遺伝学的スクリーニングにより多数の変異系統が単離されており、その中から研究目的にあった変異体入手・利用することができる。

これらに加え、選択的かつ conditional な細胞破壊法 (NTR/Mtz システム : 図 2) がごく最近になって開発された (Curado *et al.* 2007 など)。この方法では、大腸菌由来の還元酵素 nitroreductase (NTR) を細胞特異的プロモータの制御下で発現するトランスジェニック系統を樹立し、NTR の基質 metronidazole (Mtz) を任意の時間にトランスジェニック個体に対して投与することにより、狙った細胞のみをコンディショナルに破壊することが可能である。従来法 (毒素遺伝子の過剰発現) に比べて特異性が高く、生体に対する副作用がほとんどないのが特長である。

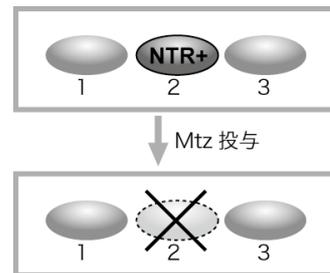


図 2 : NTR/Mtz による選択的な細胞破壊法。NTR を発現させた細胞 2 は Mtz 投与により破壊される (下)。それ以外の細胞 1 と 3 はインタクトのまま保持される。

本研究ではこれらのゼブラフィッシュの特長を効果的に利用することにより、体色変化の光制御に関与する光受容細胞・光受容分子の同定を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、体色変化に関与する網膜高次ニューロンおよび非視覚型オプシンを同定し、体色変化の光制御の分子メカニズムに迫ることである。その戦略として、体色の変化を定量化する解析システムの開発が不可欠であるが、これを個体レベルで実現した解析例はない。本研究では最初のステップとして、ゼブラフィッシュ幼生の体色変

化を定量化する測定系を構築し、実験基盤の整備を行う。次に体色変化の光受容分子の候補として、ゼブラフィッシュのゲノムデータベース上に存在する非視覚型オプシン遺伝子群の中から、網膜高次ニューロンに発現する非視覚型オプシンを網羅的に探索する。非視覚型光受容に関するこれまでの研究結果を洗い直すと、複数の非視覚型オプシンが同一細胞に存在して体色変化を制御する可能性や、これに加えて視細胞も体色変化に寄与する可能性など、分子・細胞の両レベルでの『機能重複』を想定しなくてはならない。そこで細胞レベルでの機能重複に効果的な方法として、視細胞や非視覚型オプシン発現ニューロンの選択的な細胞破壊システムを確立し、体色変化に関わる光受容細胞を同定する。さらにこの光受容細胞に発現する非視覚型オプシンの機能阻害実験を行い、体色変化に関与する光受容分子を同定する。これら一連の研究により、体色変化の光制御の分子メカニズム解明に向けての道を切り拓く。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュ幼生における体色変化の測定 ゼブラフィッシュ幼生は麻酔下では体色変化を示さないため、生きたまま無麻酔で幼生を固定する至適条件を検討した結果、メチルセルロースと低融点アガロースを併用することによりこれを実現した。固定した幼生の体表における黒色素（メラノソーム）の形態を、実体顕微鏡と冷却 CCD カメラを組み合わせた測定システムを用いてタイムラプス画像として記録した。この画像から幼生の黒化度を計算し、体色の指標とした。

視細胞の選択的破壊実験 ゼブラフィッシュのロドプシン遺伝子 (*rho*: 桿体特異的) および錐体 G 蛋白質 α サブユニット *Gt2a* 遺伝子 (*gnat2*: 錐体特異的) のプロモータを用いて、視細胞特異的に Nitroreductase (NTR)-mCherry 融合遺伝子を発現する組換えゼブラフィッシュ系統 [*Tg(gnat2:Nm; rho:Nm)*] を樹立した。これらの組換え個体に対してプロドラッグ (Mtz) を種々の条件で投与し、特異的かつ効率良く、桿体もしくは錐体の細胞変性を誘導する至適条件を見出した。この条件下で Mtz を投与した個体の視覚行動 (OKR) を測定し、視細胞が機能的にも欠損していることを確認した。これらの

個体における光依存的な体色変化を、上述の方法で定量的に測定した。

4. 研究成果

ゼブラフィッシュ幼生における体色変化測定系の構築 体色変化の光制御の分子メカニズム解明のための実験基盤として、ゼブラフィッシュ幼生の体色変化を定量化する測定系を構築した。ゼブラフィッシュの体色変化は麻酔下では測定できないため、生きたまま個体の動きを制限する固定法を開発した。このシステムによりゼブラフィッシュ幼生の光依存的な体色変化を測定したところ、個体発生が進行するとともに、体色変化のパターンが遷移することを見出した (図 3)。すなわち、体表に黒色素胞が現れたばかりの幼生 (受精後 2 日) では、光照射と共に黒色素胞内で色素顆粒が拡散し、体色が暗化した。ところが受精後 3 日になると、色素顆粒の拡散に遅れて、逆方向の反応 (凝集) が起こり、体色が明化した。この「凝集」の度合いや速度は受精後 4 日になるとさらに大きくなり、受精後 5 日では色素顆粒凝集、すなわち体色明化が主になった (図 3)。成魚は光依存的な体色明化を示すので、成魚タイプの光制御システムは受精後 5 日においてほぼ完成する、と結論した。

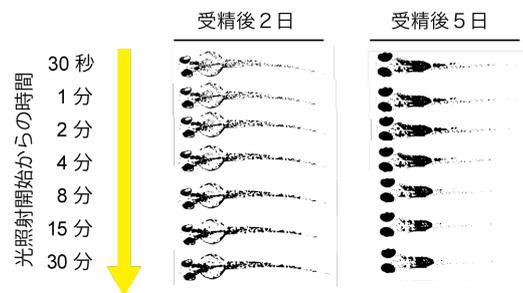


図 3 : ゼブラフィッシュ幼生における体色変化

次にこのような体色変化を制御する光受容体がどの器官に存在するかを検討するため、ゼブラフィッシュ幼生の器官切除実験を行った。受精後 2 日における光依存的な体色暗化は、幼生の尾側半分を残した状態においても維持されることがわかった。このステージでの体色暗化は、色素細胞自体に存在する光受容分子により駆動される可能性が高い。一方、受精後 5 日の幼生から眼球を除去すると、色素顆粒凝集が消失し、拡散 (体色の暗化) のみが観察された。このことからゼブラ

フィッシュ幼生の色素顆粒凝集（体色の明化）は、多くの硬骨魚類の成魚と同様、眼球の光受容体により制御されることが明らかになった [Shiraki et al. 2010]。

視細胞を特異的に破壊するトランスジェニック動物の解析 ゼブラフィッシュの「成魚型」体色変化は眼球の光受容により制御されるが、視細胞は必要ないことが示唆されている。これを検証するために、NTR/Mtz システム (図2) を利用して、ゼブラフィッシュ視細胞を選択的かつコンディショナルに破壊する系を確立した。まず、ゼブラフィッシュの視細胞、すなわち桿体と錐体の両方にNTR の選択的発現を誘導するトランスジェニック系統 [Tg(gnat2:Nm; rho:Nm)] を作製し、NTR-mCherry が所定の細胞に発現していることを、桿体と錐体に特異的な抗体を用いて免疫染色により確認した。この Tg 幼生の飼育水に 10 mM Mtz を投入して 48 時間飼育したところ、桿体と錐体の両者の選択的変性が観察された。さらに、眼球運動 (optokinetic response, OKR) を指標にした視覚機能の解析により、Mtz を投与した Tg 幼生において視細胞が機能的にも欠損していることを確認した。この視細胞欠損個体を用いて光依存的な体色変化を定量的に測定したところ、体色変化の光依存性は正常であり、陰性コントロール群 (野生型および Mtz 非投与 Tg 個体) と比較して有意な差は認められなかった (図4)。この結果から、ゼブラフィッシュ幼生の光依存的な体色変化には錐体・桿体いずれの視細胞も必要ではないと結論した。本研究により、眼球内の他の光受容細胞による光制御が体色変化において重要な役割を果たすことが強く示唆された。

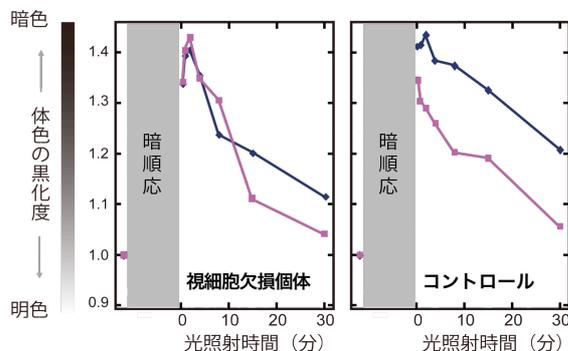


図4：視細胞欠損個体の光依存的な体色変化の定量的解析。Mtz 投与により視細胞を欠損させた Tg 個体 (左) はコントロール群 (右) と同様、正常な光依存的な体色変化 (明化) を示した。

網膜に発現する非視覚型オプシンの検索

ゼブラフィッシュのゲノムデータベースにおいて非視覚型オプシン遺伝子群を検索した。これらの非視覚型オプシン遺伝子の組織特異性を RT-PCR 法により調べた結果、VAL-opsinA/B・Opn4・Opn5 など、一部のオプシン遺伝子がゼブラフィッシュ幼生の眼球に発現することを確認した。これらのうち Opn5 は硬骨魚類から哺乳類まで脊椎動物に広く維持されている非視覚型オプシン遺伝子であるが、その機能については全くの未知であった。私共は Opn5 の組換えタンパク質を調製・精製することに成功し、Opn5 が UV 感受性の光センサー蛋白質であることを明らかにした [Kojima et al. 2011]。

非視覚型オプシン遺伝子のプロモータ解析

これまでに視細胞以外の網膜ニューロンに発現することが判明した非視覚型オプシン遺伝子のうち、VAL-opsinB 遺伝子 (valopb) に注目して、プロモータ解析を進めた。valopb の全領域を含む BAC クローンを鋳型にして、大腸菌を用いた相同組換えを行い、valopb の exon1 領域を GFP 遺伝子に置換した。この BAC コンストラクトをゼブラフィッシュ受精卵に微量注入し、この受精卵より発生した個体の中から、組換え系統を樹立することに成功した。さらに、valopb 発現細胞の選択的破壊を行うため、同様の方法により NTR-mCherry 融合遺伝子を組み込んだトランスジェニック系統も樹立した。

体色変化の波長依存性の定量解析系の構築

体色変化に関与する光受容分子を推定するため、刺激光の波長依存性や強度依存性を測定するシステムを新たに構築した。具体的には、(1) 体色変化を引き起こす「刺激光」として任意の波長の可視光を幼生に照射し、(2) これとは別に赤外光を「測定光」として幼生に照射して体表のメラニン色素の凝集・拡散を測定した。このシステムを用いて野生型の幼生の体色変化を測定したところ、刺激光強度に依存して体色変化の度合いが変化することを確認した。また、刺激光の波長を変えて測定したところ、長波長の光に対する応答性がより小さいことを見出した。この測定システムを用いて上述の視細胞欠損系統の光作用スペクトルを測定することにより、体色変化を制御する光受容分子の実体に近づくことができるかと期待される。

5. 主な発表論文等（研究代表者に下線）

〔雑誌論文〕（計3件：全て査読有り）

1. Daisuke Kojima^{*}, Suguru Mori^{*}, Masaki Torii^{*}, Akimori Wada, Rika Morishita, Yoshitaka Fukada[#] (*同等貢献; #責任著者): UV-sensitive photoreceptor protein OPN5 in humans and mice. *PLoS ONE*, **6**, e26388 (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0026388
2. Fivos Vogalis^{*}, Tomoya Shiraki^{*}, Daisuke Kojima^{*}, ほか8名 (*同等貢献) : Ectopic expression of cone-specific G-protein-coupled receptor kinase GRK7 in zebrafish rods leads to lower photosensitivity and altered responses. *J. Physiol.* **589**, 2321-2348 (2011). DOI: 10.1113/jphysiol.2010.204156
3. Tomoya Shiraki, Daisuke Kojima, Yoshitaka Fukada: Light-induced body color change in developing zebrafish. *Photochem. Photobiol. Sci.* **9**, 1498-1504 (2010). DOI: 10.1039/c0pp00199f

〔学会発表〕

（計14件うち主要な5件を以下に記載）

1. 小島大輔 視覚の光受容細胞における感度調節とノイズ低減の分子機構。日本動物学会第82回大会 シンポジウム「視覚と嗅覚における似て非なる神経機構のリサーチフロント」, 旭川, 2011年9月21日 【招待講演】
2. Daisuke Kojima: Non-visual photoreception in vertebrates, in the symposium "Evolutionary Biochemistry and Physiology of Photoreception in Animals." *The 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB2011)*, Nagoya, JAPAN, June 4, 2011. 【招待講演】
3. 小島大輔 ゼブラフィッシュの体色変化を制御する光センサーの探索。日本動物学会第81回大会 シンポジウム「光感覚系の進化と多様性：仕組みと意義」, 東京, 2010年9月24日 【招待講演】
4. Daisuke Kojima, Sho Matsumoto, Tomoya Shiraki, Yoshitaka Fukada: Light-induced body color change in the transgenic zebrafish conditionally lacking retinal rod and cone photoreceptors. *The 9th International Conference on Zebrafish Development &*

Genetics, Madison, U.S.A., June 18, 2010.

【口頭発表】

5. 小島大輔 ゼブラフィッシュの体色変化を制御する光センサーの探索。分子研研究会「拡がるロドプシンの仲間から何がわかるか・何をもたらすか」, 岡崎, 2010年3月24日 【招待講演】

〔図書〕（計4件）

1. 小島大輔 ゼブラフィッシュ。研究者が教える動物飼育 第3巻「ウニ, ナマコから脊椎動物へ」(日本比較生理生化学会編, 共立出版), pp 79-85 (2012).
2. 小島大輔 モデル脊椎動物としてのゼブラフィッシュ。研究者が教える動物飼育 第3巻「ウニ, ナマコから脊椎動物へ」(日本比較生理生化学会編, 共立出版), pp 86-87 (2012).
3. 小島大輔 ゼブラフィッシュの飼育。比較生理生化学 **27**, 28-31 (2010).
4. 小島大輔, 白木知也 光による体色のコントロール。動物の多様な生き方 第1巻「見える光、見えない光：動物と光のかかわり」(寺北明久, 蟻川謙太郎編, 共立出版), pp 209-221 (2009).

〔その他〕

ホームページ（研究成果の公開）

<http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/fukada-lab/research-highlights/rh2008/shiraki2010-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 大輔 (KOJIMA DAISUKE)

東京大学・大学院理学系研究科・講師

研究者番号：60376530

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし