

機関番号：24402

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22687005

研究課題名(和文) 松果体で行われる色弁別の生理的役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of the pineal wavelength discrimination in lower vertebrates

研究代表者

小柳 光正 (MITSUMASA, KOYANAGI)

大阪市立大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30379276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,500,000円、(間接経費) 5,850,000円

研究成果の概要(和文)：下等脊椎動物は、眼以外にも松果体という脳の一部で、環境光に含まれるUV光と可視光の比率、すなわち“色”情報を得ていることが古くから知られている。本研究で私たちは、さまざまな下等脊椎動物に対して、松果体色弁別のUV光受容タンパク質であるパラピノプシンを起点とした解析を行い、松果体色弁別の分子基盤の多様性と普遍性を明らかにした。さらに、パラピノプシンに着目した遺伝子導入ゼブラフィッシュを用いた解析から、松果体色弁別の生理的役割を示唆する知見を得た。また、他の眼外光受容タンパク質の機能解析にも成功し、光受容タンパク質が眼外組織で機能するために重要な性質を見出した。

研究成果の概要(英文)：In lower vertebrates, pineal and related organs detect the ratio of UV to visible lights, suggesting that wavelengths of environmental light are discriminated by these organs independently of eyes. Recently, we found that parapinopsin is a UV sensitive photopigment that underlies the UV reception for wavelength discrimination in the lamprey pineal. Here, we carried out the parapinopsin-based investigation of the pineal wavelength discrimination in varied lower vertebrates and revealed the diversity and generality of the wavelength discrimination mechanism. Furthermore, by using transgenic technique, we obtained a clue to the physiological roles of the pineal wavelength discrimination. We also found that a homologue of another non-visual photopigment Opn3 has a unique characteristic for functioning as a light sensor in extraocular tissues.

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：生理学 光生物学 感覚 色覚 ロドプシン

1. 研究開始当初の背景

光は動物にとって重要な刺激の一つであり、光情報を視覚や概日リズムの光調節に用いている。光には明暗の情報に加え、波長、すなわち色の情報が含まれており、多くの動物が色覚として利用している。さらに下等脊椎動物では、眼外の光受容器官である松果体やその関連器官、いわゆる「第三の眼」においても波長弁別を行っていることが古くから知られている。例えば、トカゲの頭頂眼では青色光と緑色光の比率を検出しており、両生類、魚類、円口類ヤツメウナギの松果体ではUV光と可視光の比率を検出している。この松果体での“色”弁別は、動物にとって眼以外で行われる唯一の色の利用であり、その情報をどのような目的に使っているのか非常に興味深い。一方、松果体色弁別は現象としては知られていたものの、分子基盤が不明であったために、踏み込んだ研究はほとんどなされてこなかった。特に、最も興味を持たれる松果体色弁別の生理的役割については全く明らかとなっていない。

私たちはこれまで、動物の光受容において最初に光をキャッチするタンパク質であるロドプシンおよびその類似光受容タンパク質(ロドプシン類)の分子特性の解析を行ってきた。ロドプシン類は、単に光受容の入り口に位置するだけでなく、どのような波長の光を吸収するのか、どのような細胞応答を引き起こすかの大部分を決定するので、その性質は生理機能と密接に関わっている。近年私たちは、ヤツメウナギ松果体において色弁別に関わるUV光受容タンパク質パラピノプシンを同定した(Koyanagi et al., PNAS 2004; Kawano-Yamashita et al., J. Exp. Biol. 2007)。このパラピノプシンの発見によって、松果体色弁別の分子を起点とした研究が可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、松果体色弁別の光受容タンパク質であるパラピノプシンに着目し、下等脊椎動物の松果体でおこなわれる色弁別について、次の2点を目的とした。

(1) 円口類や魚類の松果体およびトカゲの頭頂眼における色弁別の分子基盤を調べ、松果体色弁別メカニズムの多様性・一般性を明らかにする。

(2) パラピノプシンを標識した遺伝子導入ゼブラフィッシュを作製し、それを用いて松果体色弁別の生理的役割を探る。

3. 研究の方法

(1) 松果体色弁別の分子基盤の解明

魚類および爬虫類のパラピノプシン遺伝子を単離し、動物培養発現系を用いてパラピノプシンの光受容タンパク質としての性質を明らかにする。また、免疫組織化学的解析を行い、松果体あるいは頭頂眼でのパラピノ

プシンの分布を明らかにするとともに、松果体光受容細胞で光情報伝達に関わる他の分子についても局在や性質を調べる。

(2) 遺伝子導入ゼブラフィッシュを用いた松果体色弁別の生理的役割の解明

ゼブラフィッシュパラピノプシンのプロモーターを取得し、そのプロモーターを用いてレポーター遺伝子を導入することで、パラピノプシン発現細胞およびその神経投射を可視化する。さらに、経シナプストレーサーである小麦胚芽レクチン(WGA)を導入することで、パラピノプシン発現細胞から始まる松果体色弁別の脳内投射を明らかにする。

4. 研究成果

(1) イグアナ頭頂眼における色弁別のUV受容タンパク質の同定

トカゲ類に見られる頭頂眼は松果体関連器官の一種であり、色弁別を行っていることが古くから知られている。特に、イグアナの頭頂眼では、UV光と緑色光の比率として色を弁別していることがわかっていたが、その分子基盤は不明であった。私たちは、イグアナの近縁種であり全ゲノム塩基配列が決定されているアノールトカゲのゲノムデータベース中にパラピノプシン遺伝子断片を見出し、その情報にもとづき、イグアナからパラピノプシンを単離した。さらに、イグアナパラピノプシンの分光学的解析および免疫組織化学的解析に成功し、イグアナパラピノプシンはヤツメウナギパラピノプシンと同様、UV感受性光受容タンパク質で、頭頂眼の光受容細胞の光受容部位に局在していることを明らかにした。興味深いことにパラピノプシンは、緑色感受性光受容タンパク質であるパリエトプシンと同じ細胞に存在していた(図1)。先行研究において、頭頂眼で

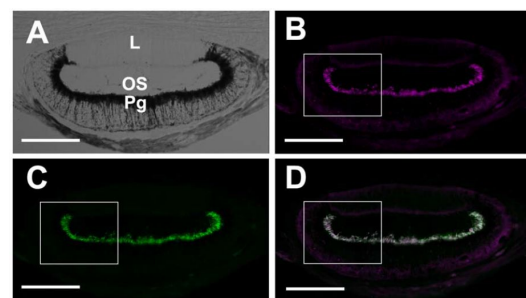


図1 イグアナ頭頂眼におけるパラピノプシンとパリエトプシンの共局在
イグアナ頭頂眼(A)において、パラピノプシン(B)はパリエトプシン(C)と同一細胞に発現している(D)。

青色光と緑色光の比率を検出する別種のトカゲでは、青色光受容タンパク質と緑色光受容タンパク質が同一細胞に存在し、色弁別を支えていること報告されている。このことを考え合わせると、イグアナ頭頂眼では、同一細胞に発現しているパラピノプシンとパリエトプシンによって、UV光と可視光の比率の検出が行われていると考えられる(Wada et

al., 2012 PLoS ONE)

本成果は、パラピノプシンが、松果体のみならず、頭頂眼においても UV 光と可視光の検出による色弁別に関わることを初めて示すものであり、すなわちパラピノプシンが下等脊椎動物松果体関連器官の色弁別の基本分子であることを示唆するものである。

(2) ヤツメウナギ松果体のパラピノプシン発現細胞で機能するアレスチンの同定

松果体の色弁別の UV 受容の分子基盤をより詳細に理解するために、パラピノプシンから始まる光情報伝達に関わる分子の解析を行った。特に、パラピノプシンと直接相互作用し、光情報伝達の遮断に関わるアレスチンに注目して、免疫組織化学的手法および生化学的手法を用いて解析した。その結果、一般に視物質が視覚専用のアレスチン(視覚アレスチン)と共役するのに対して、パラピノプシンは、光受容タンパク質以外の G タンパク質共役型受容体(GPCR)と共役するβアレスチンと共役することが明らかとなった。βアレスチンは視覚アレスチンと異なり、情報伝達の一時的な遮断だけでなく、受容体を細胞膜上から取り除く(internalization)ことで情報伝達を完全に終息させることが知られている。実際、松果体のパラピノプシン発現細胞においても光依存的なパラピノプシンの細胞内移動が観察された。この光受容タンパク質とアレスチンの関係は、機能的な側面から以下のように説明することができる。視物質は光を受けると最終的に自己崩壊する(退色する)ため、情報伝達の終息に internalization は必要ないのに対して、パラピノプシンの光産物(活性化状態)は安定なため、情報伝達を終息させるためには internalization 機能をもつβアレスチンが適していると考えられる。言い換えれば、視物質の退色するという性質の獲得が、internalization 機能をもたない視覚アレスチンとの新しい共役を生み出したと言えるかもしれない(Kawano-Yamashita et al., 2011 PLoS ONE; Terakita et al., 2012 WIREs Membr Transp Signa、図 2)

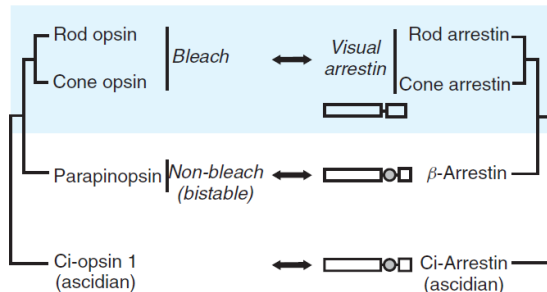


図2 光受容タンパク質とアレスチンとの機能的・進化的関連

本成果は、光情報伝達の遮断にβアレスチンが関わることを初めて示したもので、それによって、光受容タンパク質とアレスチンの機能的・進化的関連が浮き彫りになった。

(3) 遺伝子導入ゼブラフィッシュを用いた松果体色弁別の生理的役割の解明

ゼブラフィッシュのパラピノプシンのプロモーター配列を取得し、その配列を用いることで、松果体のパラピノプシン発現細胞を選択的に GFP 標識したトランスジェニックゼブラフィッシュの系統の樹立に成功した。さらに、そのプロモーターを用いて、経シナプストレーサーである WGA をパラピノプシン発現細胞で発現させたところ、シナプスを介した神経ネットワークが可視化され、パラピノプシンが受容した UV 光情報、すなわち色弁別情報が伝えられる脳内領域の特定に成功した(Koyanagi et al., 論文投稿中)

(4) 眼外光受容タンパク質 Opn3 の機能解析

パラピノプシンと同様、さまざまな動物で眼以外の組織で発現が認められている Opn3 について分子特性の解析を試みた。私たちは Opn3 ホモログの分光学的解析に成功し、Opn3 ホモログが青色光あるいは緑色光感受性の光受容タンパク質として機能し、Gi, Go 型 G タンパク質を光依存的に活性化することを見出した。また、光受容タンパク質として機能するためには、一般に、眼などに存在する特別な型のレチナール(11 シス型レチナール)を結合する必要があるが、興味深いことに Opn3 ホモログは、生体内のどこにでも存在する型のレチナール(13 シス型レチナール)を結合することでも光受容タンパク質として機能することができた(図 3)。実際、

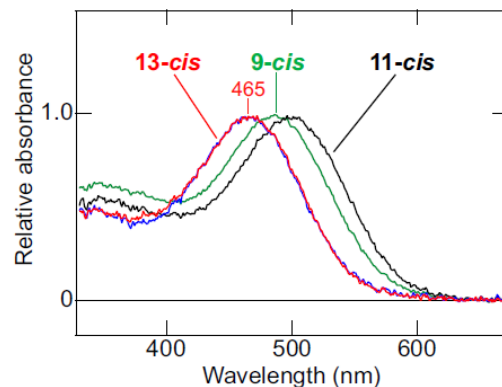


図3 多様な型のレチナールを発色団として機能できる Opn3 ホモログ

Opn3 を発現細胞は、特に 11 シス型レチナールを加えなくても、培地の血清中に含まれるわずかなレチナール(11 シス型レチナールはほとんど含まれていない)のみで光受容タンパク質として機能できた。これらの結果は、Opn3 が実際に眼以外のさまざまな組織で光受容を担っていることを強く示唆している(Koyanagi et al., 2013 Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)

本成果は、13 シス型レチナール結合能という、光受容タンパク質が眼外組織で機能するために重要な性質を初めて報告するもので、松果体色弁別を含む、眼外光受容の研究にお

いて重要なものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

M. Koyanagi, A. Terakita: Diversity of animal opsin-based pigments and their optogenetic potential. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 710-716 (2014) 査読あり

DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.09.003

M. Koyanagi, E. Takada, T. Nagata, H. Tsukamoto, A. Terakita: Homologs of vertebrate Opn3 potentially serve as a light sensor in nonphotoreceptive tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110 (13), 4998-5003 (2013)査読あり

DOI: 10.1073/pnas.1219416110

S. Wada, E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi, A. Terakita: Expression of UV-sensitive parainopsin in the iguana parietal eyes and its implication in UV-sensitivity in vertebrate pineal-related organs. *PLoS One* 7 (6):e39003 (2012)査読あり

DOI: 10.1371/journal.pone.0039003

A. Terakita, E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi: Evolution and diversity of opsins. *WIREs Membr Transp Signa* 1, 104-111 (2012) 査読あり

DOI: 10.1002/wmts.6

T. Nagata, M. Koyanagi*, H. Tsukamoto, S. Saeki, K. Isono, Y. Shichida, F. Tokunaga, M. Kinoshita, K. Arikawa, A. Terakita*: Depth perception from image defocus in a jumping spider. *Science* 335, 469-471 (2012) 査読あり

DOI: 10.1126/science.1211667

小柳光正, 寺北明久: 視覚の分子基盤の進化・多様性: 動物の多様なロドプシンとシグナル伝達系の比較から何がわかるか *細胞工学* 30 (3) 2011年3月号 p288-294 査読なし

E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi, Y. Shichida, T. Oishi, S. Tamotsu, A. Terakita: Beta-arrestin functionally regulates the non-bleaching pigment parainopsin in lamprey pineal. *PLoS One* 6 (1):e16402 (2011)査読あり

DOI: 10.1371/journal.pone.0016402

T. Nagata, M. Koyanagi, A. Terakita: Molecular Evolution and Functional Diversity of Opsin-Based Photopigments. *Photobiological Sciences Online* (2010)査読あり

<http://www.photobiology.info/>

M. Wakakuwa, A. Terakita, M. Koyanagi, D.G. Stavenga, Y. Shichida, K. Arikawa: Evolution and mechanism of spectral tuning

of blue-absorbing visual pigments in butterflies. *PLoS One* 5 (11):e15015 (2010) 査読あり

DOI: 10.1371/journal.pone.0015015.

[学会発表](計58件)

M. Koyanagi: Functional diversity of pineal photopigment parainopsin. 6th Asia & Oceania Conference on Photobiology (AOCP) 2013年11月11日 Novotel Sydney Central (Sydney, Australia)招待講演

S. Wada, E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi, A. Terakita: UV-sensitive parainopsin in the Iguana parietal eyes. 6th Asia & Oceania Conference on Photobiology (AOCP) 2013年11月11日 Novotel Sydney Central (Sydney, Australia)

小柳光正: 分子進化学的・分子生理学的アプローチによる動物の光受容の分子基盤の研究 日本動物学会第84回大会 2013年9月27日 岡山市民会館(岡山市)招待講演

小柳光正・杉原智博・永田崇・寺北明久: 培養細胞を用いた非視覚型光受容タンパク質 Opn3 発現細胞の光反応性の解析 日本動物学会第84回大会 2013年9月26日 岡山大学・津島キャンパス(岡山市)

和田清二・山下(川野)絵美・保智己・小柳光正・寺北明久: 硬骨魚類松果体の波長識別に関わる光受容タンパク質の探索 日本動物学会第84回大会 2013年9月26日 岡山大学・津島キャンパス(岡山市)

小坂成章・山下(川野)絵美・和田清二・小柳光正・寺北明久(2013), ゼブラフィッシュ松果体の波長識別に関わる光受容細胞の神経投射の解析, 日本動物学会第84回大会 2013年9月26日 岡山大学・津島キャンパス(岡山市)

S. Wada, E. Kawano-Yamashita, S. Tamotsu, M. Koyanagi, A. Terakita: Investigation of the molecular basis of the wavelength discrimination in the lamprey pineal organs. 日本比較生理生化学会第35回大会 2013年7月13日 イーグレ姫路(兵庫県姫路市)

和田清二・山下(川野)絵美・保智己・小柳光正・寺北明久: 下等脊椎動物の波長識別能を持つ松果体における光受容タンパク質の同定と解析 日本動物学会第83回大会 2012年9月13日 大阪大学・豊中キャンパス(大阪府豊中市)

山下(川野)絵美・小柳光正・和田清二・寺北明久: 松果体 UV 光受容タンパク質パラピノプシンと共役する G タンパク質の免疫組織化学的同定 日本動物学会第83回大会 2012年9月13日 大阪大学・豊中キャンパス(大阪府豊中市)

小柳光正：光受容タンパク質の分子進化と生理機能との連関 日本進化学会第14回大会 2012年8月22日 首都大学東京・南大沢キャンパス（東京都）招待講演

小柳光正・和田清二・山下（川野）絵美・寺北明久：下等脊椎動物における松果体関連器官の波長識別システムの多様性 日本進化学会第14回大会 2012年8月22日 首都大学東京・南大沢キャンパス（東京都）

S. Wada, E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi, A. Terakita: Identification and characterization of UV-sensitive parapinopsin in the Iguanaparietal eyes 日本比較生理生化学会第34回大会 2012年7月6日 湘南国際村センター（神奈川県葉山市）

小柳光正・塚本寿夫・寺北明久：松果体の波長識別に關与するパラピノプシンの波長制御機構の解析 日本動物学会第82回大会 2011年9月22日 神楽地区公共施設群（北海道札幌市）

M. Koyanagi, E. Yamashita-Kawano, S. Wada, H. Tsukamoto, Y. Shichida and A. Terakita: Diversity of non-visual photopigment parapinopsin and evolution of pineal color discrimination. Annual Conference of Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE2011) 2011年7月28日 京都大学（京都市）

M. Koyanagi, E. Yamashita-Kawano, S. Wada, H. Tsukamoto, Y. Shichida and A. Terakita: Diversity and Evolution of Non-visual Photopigment Parapinopsin. FASEB Summer Research Conferences The Biology and Chemistry of Vision 2011年6月22日 Carefree Resort (Carefree, Arizona, USA)

M. Koyanagi and A. Terakita: Diversity and evolution of opsin-based pigments in non-visual function. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB2011) 2011年6月4日 名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）招待講演

小柳光正：松果体における色識別と光受容タンパク質の進化・多様性 日本動物学会第81回大会 2010年9月24日 東京大学・駒場キャンパス（東京都）招待講演

和田清二・山下（川野）絵美・小柳光正・川上浩一・寺北明久：遺伝子導入ゼブラフィッシュを用いた松果体パラピノプシン発現細胞の神経投射の解析，日本動物学会第81回大会 2010年9月23日 東京大学・駒場キャンパス（東京都）

小柳光正：光受容タンパク質の多様性と光受容システムの進化，日本遺伝学会第82回大会 2010年9月22日 北海道大

学（北海道札幌市）招待講演

M. Koyanagi, E. Yamashita-Kawano, H. Tsukamoto, S. Wada, Y. Shichida, and A. Terakita: Functional Analyses of Pineal Bistable Pigment Parapinopsins in Teleosts. The 14th International Conference on Retinal Proteins, 2010年8月4日 UCSC Porter College (Santa Cruz, California, USA)

〔その他〕

新聞報道等

共同通信、朝日新聞、読売新聞、日本経済新聞、産経新聞（2012年1月27日）、The New York Times（2012年1月30日）他

ホームページ等

大阪市立大学大学院理学研究科生体高分子機能学II研究室

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/mphys/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柳 光正（KOYANAGI MITSUMASA）
大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：30379276

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし