

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23247011

研究課題名(和文)単離細胞を用いた非視覚型ロドプシン類の機能多様性に関する分子生理学的解析

研究課題名(英文)Molecular physiological study on functional diversity of non-visual rhodopsins by using isolated cells

研究代表者

寺北 明久(Terakita, Akihisa)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：30212062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,700,000円

研究成果の概要(和文)：ロドプシン類の機能多様性について、分子生理学的に解析をおこなった。その結果、ゼブラフィッシュやヤツメウナギの水平細胞に存在するメラノプシンは、光依存的に細胞内カルシウム濃度を上昇させる能力があり、ヤツメウナギでは薄明視にかかわる視細胞の機能調節に関わる可能性を見出した。また、メラノプシンに系統的に近い関係にある視物質の吸収特性が、ハエトリグモにおいて、奥行き知覚に貢献していることを発見した。さらに、エンセファロプシンのホモログは、Gi型Gタンパク質を介して、細胞内cAMP濃度を減少させる能力を持つことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Functional properties of diverse rhodopsins were investigated. We found that melanopsins in the zebrafish and lamprey horizontal cells had an ability to elevate intracellular calcium concentration upon light absorption. We also found that melanopsin-expressing horizontal cells connected to visual cells containing rhodopsin, which is basically involved in twilight vision, in the lamprey. In the jumping spider, absorption characteristics of a visual pigment, which is phylogenetically close to melanopsins, contributes to depth perception. In addition, homologs of vertebrate encephalopsins had an ability to decrease intracellular cAMP level via Gi type G protein activation.

研究分野：動物生理・行動

キーワード：ロドプシン類 視物質 非視覚

1. 研究開始当初の背景

動物は、光を受容し、それを視覚や視覚以外の機能調節のために用いている。多くの場合、光は光受容タンパク質であるオプシン類により受容される。これまでに、数千種類ものロドプシンがさまざまな動物種から単離され、それらは分子系統的に8つの種類に分けられることが明らかになっている(図1)。本研究では、光受容系の多様性・共通性のさらなる理解のために、脊椎動物を含む新口動物と旧口動物とに広く存在する Gq 共役ロドプシン類(メラノプシンと旧口動物視物質)とエンセファロプシン(Opn3)類に注目した。

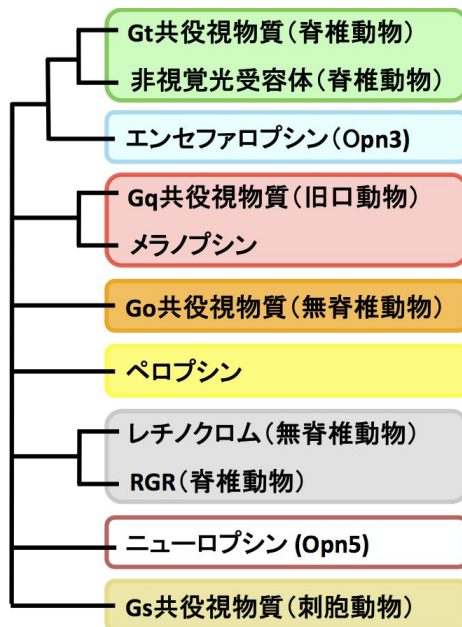


図1 ロドプシン類の分子系統関係の模式図

2. 研究の目的

(1)魚類や円口類におけるメラノプシンの機能の解析

Gq 共役ロドプシン類グループには、旧口動物の視物質(視覚型)と脊椎動物を含む新口動物の非視覚型光受容タンパク質であるメラノプシンが含まれる。メラノプシンは、哺乳類では網膜神経節細胞に存在し、概日リズム等の光センサーとして注目されている。一方、哺乳類以外の脊椎動物のメラノプシンが関わる機能についての詳細は明らかでない。本研究では、網膜の水平細胞(視細胞の機能調節を行うことが知られている細胞)に存在するメラノプシンが、どのような機能に関わるのかを推測する目的で、円口類ヤツメウナギと硬骨魚類ゼブラフィッシュのメラノプシン発現水平細胞がどのような光応答をするのかを、単離細胞、培養細胞、単一細胞を用いて解析した。また、その細胞応答がどの視細胞に伝えられるのかも明らかにすることを目的とした。

(2)ハエトリグモ視物質の吸収特性と機能

メラノプシンのオースログ遺伝子である旧口動物の視物質は受容する光の色に多様化し、色覚の分子基盤を形成している。ハエトリグモの主眼と呼ばれるもっとも大きな単眼の網膜は4層の構造を持ち、レンズの色収差のために、4層には異なる色の光が集光する(図4参照)。それぞれの網膜層にはどのような視物質が存在するのかについて、それぞれの視物質の分光感度(どのような色に感度よく反応するか)を明らかにし、その分光感度の違いがどのような機能に関わるのかを解明することを目的とした。

(3)エンセファロプシングループのロドプシン類の性質

エンセファロプシングループに属するロドプシン類は、旧口動物や脊椎動物において、脳などの一般に光受容をするとは考えられていない器官に存在している。エンセファロプシングループのロドプシン類が、どのような細胞応答を生み出す性質をもつのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)メラノプシン上流配列下で GFP を発現するゼブラフィッシュの網膜を、酵素で処理した後、機械的に破壊し、GFP ラベルされたメラノプシン発現水平細胞を単離し、カルシウム指示薬である Fura-2 や X-Rhod1 を用いて、光依存的なカルシウム濃度変化を測定した。また、ゼブラフィッシュやヤツメウナギのメラノプシンを培養細胞で発現させ、単離細胞としての培養細胞について、同様にカルシウムイメージングを行った。

また、水平細胞に存在するメラノプシンが関わる機能を推測するために、メラノプシン発現水平細胞がどの視細胞と神経的な連絡をしているのかについて、ヤツメウナギ網膜を組織化学的手法により解析した。具体的には、抗メラノプシン抗体でメラノプシン発現水平細胞を染色し、抗トランスデュシン抗体で視細胞を染色し、両者の連絡を解析した。

(2)ハエトリグモで、既に同定されている4種類の視物質(Rh1~4)が、主眼のどの層にどの視物質が分布しているのかを明らかにするために、遺伝子発現(mRNA)とタンパク質の局在を解析した。また、その局在から緑色にもっともよく感じる視物質が、ハエトリグモが目的物までの距離を測定する(奥行きを知覚する)ために重要であることを、行動実験により解析した。

(3)エンセファロプシングループのオプシンがどのような応答を生み出せるのかを、トラフグのエンセファロプシンホモログとハマダラカのエンセファロプシンホモログを培養細胞で発現させ、それらロドプシン類を精製して分光学的に解析するとともに、それらロドプシン類を発現する培養細胞の光応答を二次メッセンジャーの変化として捉えて解析した。

4. 研究成果

(1) 酵素処理し機械的に細胞を単離にした後のメラノプシンを発現している水平細胞 (GFP 蛍光を発する) は、20 度で一週間程度は形態的に安定であった。この単離細胞に Fura-2 あるいは X-Rhod1 を取り込ませ、光依存的な細胞内カルシウム濃度の変動をイメージングにより解析した結果、光照射後、数秒～数十秒以内に起こるような応答は生じなかった。一方、同様のイメージングをヤツメウナギメラノプシンやゼブラフィッシュメラノプシンを発現する培養細胞を用いて行ったところ、光依存的な一過性の顕著なカルシウム濃度の上昇が、照射後速やかに起こった (図 2)。このことから、メラノプシンの水平細胞における光応答は、培養細胞での応答とは異なる可能性も考えられた。

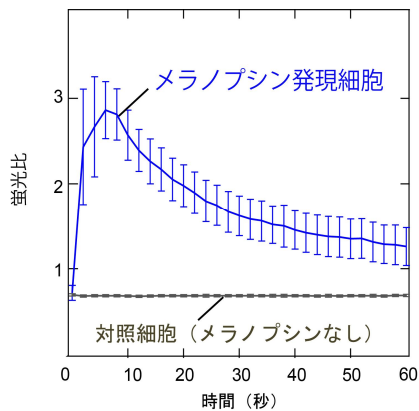


図 2 ヤツメウナギメラノプシンを発現する細胞の光依存的なカルシウム濃度変化

メラノプシン発現水平細胞がどの視細胞と連絡しているのかについて、ヤツメウナギ網膜を用いて抗メラノプシン抗体などによる免疫組織学的な解析を行った。その結果、ヤツメウナギメラノプシンは、長いタイプ (LVC) と短いタイプ (SVC) の 2 種類の視細胞の内、ロドプシンを発現する SVC に存在することが明らかになった (図 3)。すなわち、SVC は桿体視細胞に機能的に近いと考えられているので、メラノプシンは薄明視の調節に関わっているかもしれない。

(2) ハエトリグモの 4 層の視細胞層 (レンズにもっとも遠い層から第 1 層、第 2 層、第 3

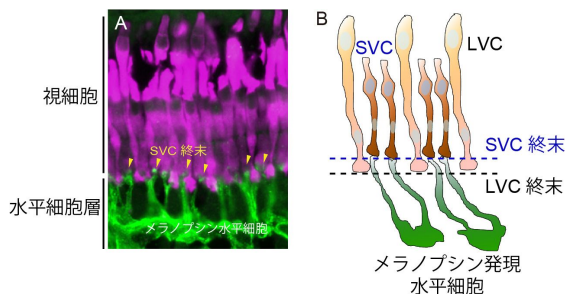


図 3 ヤツメウナギメラノプシン水平細胞とロドプシン発現視細胞 (SVC) との関係

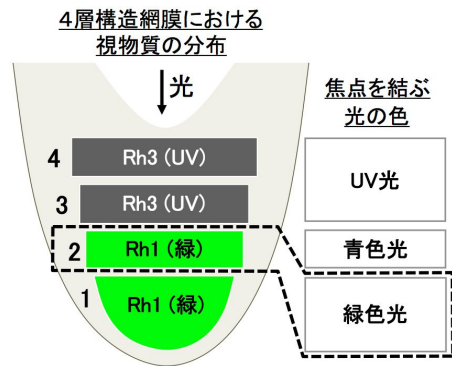


図 4 4 層構造網膜の視物質の分布と焦点を結ぶ光の色との関係

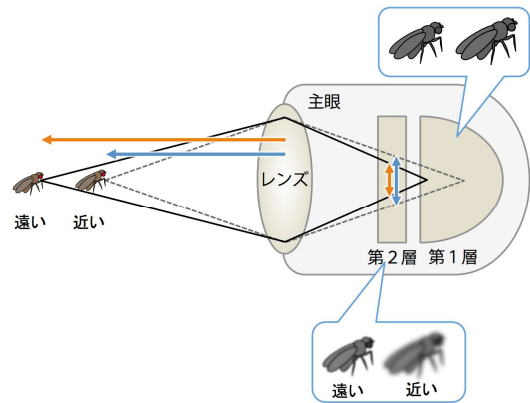


図 5 ハエトリグモの主眼の第 2 層におけるピンボケ像と対象物の距離との関係

層、第 4 層) で機能している視物質 (Gq 共役型視覚ロドプシン類) を調べたところ、第 1 層と 2 層には Rh1 という視物質が、第 3 層と 4 層には Rh3 が存在していた (図 4)。それぞれの視物質の分光感度を調べたところ、Rh1 は緑感受性で、Rh3 は紫外 (UV) 光感受性であることを見出した。第 1 層～第 4 層には、それぞれ緑色光、青色光、UV 光、UV 光が焦点を結ぶことが明らかになっている。したがって、第 1、3、4 層は焦点を結ぶ色の光と視物質の吸収極大が一致するが、第 2 層は一致しないことがわかる (図 4)。言い換えれば、第 2 層はピンボケ像を受容していることを見出した。ピンボケ像は距離の情報を持つので、ハエトリグモはピンボケの大きさから距離 (奥行き) を知覚している可能性が考えられた (図 5)。そこで、赤色光と緑色光 (ともに第 1 層に焦点を結ぶ) の下では、同じ距離にある目標物のピンボケの大きさが異なることに注目した。すなわち、赤色光下ではピンボケ量が大きくなることから、実際の位置よりも近くに目標物 (ハエ) が存在すると錯覚し、短い距離をジャンプするのはないかと予測した (図 6)。行動実験の結果、緑色光下では正確なジャンプをしたが、赤色光下では短くジャンプした。その短い度合いは、赤色光と緑色光でのレンズの屈折率の違いに基づく理論式とよく一致したことから、ハエトリグモの異なる波長感受性の視

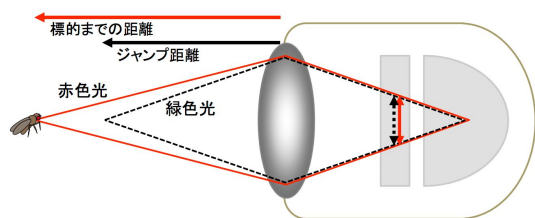


図6 ハエトリグモが赤色光下で短いジャンプをする理由

物質が距離測定という予想外の機能に貢献していることを見出した。

(3)トラフグとハマダラカのエンセファロプシンのホモログは、吸収極大を青～緑の波長領域にもち、光を受容すると安定な光産物を生じることを見出した。これらのロドプシン類を発現する培養細胞を光照射すると二次メッセンジャーである細胞内 cAMP が急速に減少することを見出した。生化学的な解析の結果とあわせると、エンセファロプシンのホモログは、Gi 型の G タンパク質を介して cAMP 合成酵素の活性を低下させ、光依存的な細胞内 cAMP の減少を生じることが明らかになった。これらホモログが存在する細胞においても、同様の光依存的な cAMP 濃度の低下を介する光応答が起こっていることが示唆された。

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16件)

L. Sun, E. Kawano-Yamashita, T. Nagata, H. Tsukamoto, Y. Furutani, M. Koyanagi and A. Terakita: Distribution of Mammalian-like melanopsin in cyclostome retinas exhibiting a different extent of visual functions. PLoS One 9, e108209 (2014) 査読あり

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

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

[学会発表](計63件)

A. Terakita: Molecular basis of wavelength discrimination in the pineal organs of lower vertebrates. 16th International Conference on Retinal Proteins (長浜ロイヤルホテル・滋賀県・長浜市) 2014年10月8日

A. Terakita: Homologues of vertebrate

OPN3 as a potential light-sensor in non-photoreceptive tissue. 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology (Sydney, Australia) 2013年11月11日
A. Terakita: Molecular and functional properties of non-visual opsins. 15th International conference on Retinal Proteins (Ascona, Switzerland) 2012年10月3日
 寺北明久: 視物質の吸収特性が生み出す意外な視覚機能: ハエトリグモのピンぼけ像による奥行き知覚 日本動物学会第82回大会(旭川市大雪クリスタルホール・北海道・旭川市) 2011年9月21日
A. Terakita: Diversity of opsin-based photopigments in non-visual function. The 5th Asia and Oceania Conference on Photobiology. (Nara New Public Hall・奈良県・奈良市) 2011年7月31日

[図書](計3件)

寺北明久: ハエトリグモに学ぶ距離測定の本メカニズム 「生物模倣技術と新材料・新製品開発への応用」(技術情報協会) 2014, 5

E. Kawano-Yamashita, M. Koyanagi, S. Wada and A. Terakita: The evolution and diversity of pineal and parapineal photopigments. In "Evolution of Visual and Non-visual Pigments" ed. by D. M. Hunt, M. W. Hankins, S. P. Colin and N. J. Marshall, Springer Series in Vision Research, Springer, 2014, 21

[その他]

新聞報道

共同通信 2012年1月27日 "クモ、目のピンぼけで距離つかむ"、朝日新聞 2012年1月27日 "ピンぼけでも捕獲"、読売新聞 2012年1月27日 "ピンぼけ度で距離測定"、日経新聞 2012年1月27日 "ピンぼけ具合で距離測る"、産経新聞 2012年1月27日 "ハエトリグモピンぼけ測定"、読売新聞 2014年3月17日 "光受容たんぱく質"

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺北 明久 (TERAKITA, Akihisa)
 大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号: 30212062

(2)連携研究者

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