

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570095

研究課題名(和文) ホヤ幼生視細胞の信号伝達系

研究課題名(英文) Photo-signal transduction in Ciona photoreceptors

研究代表者

中川 将司 (Nakagawa, Masashi)

兵庫県立大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00212085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：視細胞は、外界から光情報を受け取り、それを電気シグナルに変換してその情報を脳に送る。

脊椎動物視細胞では、PDE6という視細胞に特化した酵素がこの光変換機構に関わっている。一方、脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物であるホヤの視細胞では、PDE5(脊椎動物において、心臓、肺、血管の平滑筋等広い領域で発現している)とPDE6との共通祖先系のPDE5/6が発現していることが分かった。この結果は、ホヤから脊椎動物への進化する過程で、元祖型PDE5/6が、視細胞に特異的に機能するPDE6と臓器、血管系で機能するPDE5とに分岐したことを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The photoreceptors in the vertebrate retinae receive light signal and convert it into electric signal. PDE6 is a specific enzyme involved in the conversion process in vertebrate photoreceptors. Ascidiaceans are the closest living relatives of vertebrates. We found that ascidian photoreceptors express a PDE5/6 gene, a common ancestral gene between PDE5 which expresses in vertebrate heart, lung, vascular smooth muscle and so on, and PDE6 which expresses in vertebrate photoreceptor. This result suggests that the ancestral PDE5/6 gene evolved into photoreceptor specific PDE6 and widely expressing PDE5 during the evolution from ascidian to vertebrates.

研究分野：動物生理

キーワード：視細胞 進化 光信号伝達系 ホヤ PDE

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の眼は、無脊椎動物（旧口動物）のもの、形態学的、生理学的（受容器電位の極性）、そして視細胞内での信号伝達系に関して大きく異なる。動物の眼がある時点から独立に進化してきた結果だと考えられている。脊椎動物型眼はどのような過程を経て、その特徴を獲得していったのだろうか？それを知るには原始的な動物の眼を調べる必要がある。ホヤは脊椎動物と同じ脊索動物門に属する動物で、分子系統解析により脊椎動物にもっとも近縁な動物であることが示された。それ故、ホヤの眼の性質を脊椎動物のものと比較することにより、脊椎動物型眼がどのように進化してきたかを考察できる。

過去の研究において、ホヤ幼生視細胞の光に対する応答は脊椎動物と同様過分極性であり、またその外節構造も脊椎動物同様、繊毛型であることは既に明らかにされている。しかし、我々が免疫染色像から明らかになったホヤ幼生の視細胞の形態は、以下の点で脊椎動物のものとは異なっていた。外節はレンズに向かっており、軸索はその反対側からのびており、脊椎動物視細胞の配向が全く逆で、むしろ無脊椎動物に近い形態をしている。さらに、脊椎動物に見られるような、視細胞、双極細胞、水平細胞、神経節細胞からなる層構造は見られず、視細胞の軸索が脳の内部まで投射していた。これらの点は、無脊椎動物型に近い。このことは、ホヤの段階ではまだ脊椎動物型の眼は完成していないことを示している。

一方、視細胞内信号伝達系分子に関しては何も分かっていなかった。我々のグループは、光受容分子オプシンの遺伝子及び光情報伝達系遮断分子アレスチンの遺伝子を単離し、それらが視細胞特異的に発現していることを明らかにした。ホヤにおいて、それら以外の視細胞内信号伝達系に関与すると思われる分子（エフェクタ、ロドプシンカイネース、チャンネル等）は、まだ同定されていない。

我々は Ca^{2+} 指示タンパク質カメレオンを視細胞に発現させて、 Ca^{2+} イメージングを行ったところ、光照射に伴い視細胞内の Ca^{2+} 濃度が減少することを明らかにした（図1）。

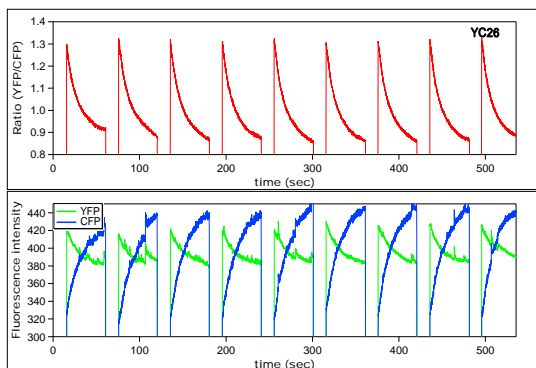


図1 ホヤ幼生視細胞の光照射による Ca^{2+} 濃度変化

この光応答性は、脊椎動物視細胞での応答と同じであった。ホヤ幼生の視物質と考えられている Ci-opsin1 に対するアンチセンスモルフォリノオリゴをホヤ受精卵に導入した結果、Ci-opsin1 タンパク質の発現を阻害した幼生では、視細胞の光応答性が消失した。この実験によって初めて、Ci-opsin1 がホヤ視細胞の真の視物質であることが示された。ホスホジエステラーゼ阻害剤である IBMX を投与すると、光応答が消失した。このことから、脊椎動物視細胞と同様、2 次メッセンジャーは環状ヌクレオチドであると推定できたが、エフェクター分子はまだ同定されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ホヤ幼生視細胞を単離し、視細胞で発現している遺伝子を解析すると共に、機能解析を行い、ホヤ視細胞のエフェクタ分子を同定する。そして、エフェクタに関してのホヤと脊椎動物と共通する点、異なる点を見出し、脊椎動物型眼がどのように進化していったのかを考察する。

3. 研究方法

(1) ホヤ幼生の細胞解離

ホヤ幼生視細胞での遺伝子発現を調べるには、視細胞を単離し、そこから cDNA を得る必要がある。視細胞特異的に、蛍光タンパク質 Cameleon を発現するトランスジェニックホヤ（図2）（筑波大・下田臨海実験センター 笹倉氏より提供）幼生の細胞解離を行い、蛍光を発する視細胞を回収することにした。ま

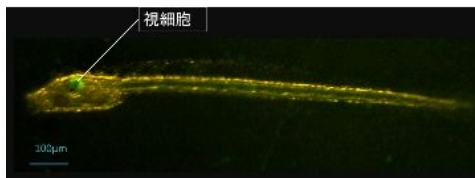


図2 Arr>YC26 Tg 幼生

ず、孵化後初期幼生で細胞解離を行っている先行研究の方法を試みた。しかし、蛍光が現れる孵化後4時間の幼生では細胞間の接着が強く、特に脳部近くの細胞は数十個以上の細胞塊になるだけであった。蛍光を発する細胞が、無蛍光の細胞と密着しており、この方法では視細胞を単離することはできなかった。また、ホヤ幼生の尾部に含まれる筋細胞は自家蛍光で緑色に光り、視細胞を単離する際に視細胞と間違えて回収してしまう可能性があることがわかった。そのため、まずコラーゲン処理して、胴部と尾部を分けて（図3）



図3 胴部と尾部の分離

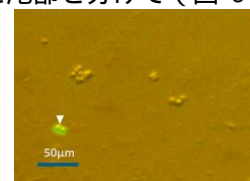


図4 単離された視細胞（矢尻）

胴部だけを回収した。続いて、胴部の細胞塊を15分間0.25%トリプシン処理することで胴部の細胞を完全に解離できた。(図4)

(2) 視細胞回収及びcDNA作製

プラートマイクロフォージを用いて作製した先端の径が約30-40 μ mのガラスチップを作製した。作製したガラスピペットをピコピペット(アルテア技研)に装着し、モニターで観察しながら視細胞を回収した。続いてRNA抽出キット(Absolutely RNA Nanoprep Kit)でトータルRNAを精製し、得られたトータルRNAは-80で保存した。2回分のトータルRNAから、cDNA合成キット(SMARTer PicoPCR cDNA Synthesis Clontech Takara)を用いてcDNAの合成を行なった。

(3) 遺伝子検索

NCBI/BLAST *Ciona intestinalis* Nucleotide data base(カタコウレイボヤゲノムデータベース)サイトから、ゼブラフィッシュのPDE6遺伝子(視細胞のPDE)を検索配列として、相同性のある遺伝子を検索した。その結果、8つの遺伝子(PDE11-like, PDE5/6, PDE10A, PDE1C, PDE9A-like, PDE4B-like, PDE9A-like2, PDE8B-like)がヒットした。

4. 研究成果

(1) ホヤ幼生から視細胞の単離

上記3で記載した方法で視細胞を回収することに成功した。得られた視細胞cDNAに、他の組織からのcDNAのコンタミがないかを確認した。視細胞に隣接して存在する色素細胞のマーカ遺伝子であるチロシナーゼ遺伝子及び視細胞に関連する遺伝子のプライマーセットを用いて、PCRを行った(図5)。視細胞関連遺伝子(CiGi, GC1(グアニジンサイクレス), Rx, Ci-opsin)では強いバンドが見られた。一方、色素細胞で強く発現するチロシナーゼ遺伝子のバンドは検出できなかった。この結果は、他の細胞のコンタミは無く、視細胞のみが回収されていることを示している。ホヤ幼生を細胞解離する方法が確立し、視細胞のcDNAを得ることができた。

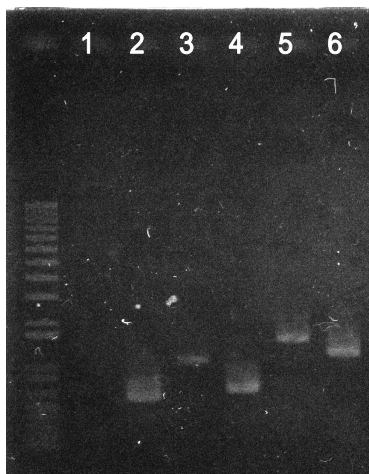


図5
1:Tyrosinase
2:GiGi
3:GRK5
4:GC1
5:Rx
6:Gi-opsin

(2) ホヤ幼生視細胞の遺伝子発現解析

得られた視細胞cDNAをテンプレートとして、PCRにより各PDEタイプの相対的発現量を調べた。配列から推定される T_m 値は場合によっては、最適なアニーリング温度でない場合がある。そこで先ず、 T_m 値 ± 3 でPCRを行い、最適アニーリング温度を決定した(図6)。得られた最適 T_m 値を用いて、PCRを行い20サイクルから3サイクル毎にPCR産物を抽出し、電気泳動でバンド濃さを比較した(図7)。その結果、視細胞ではPDE5/6が他のPDEに比べ一桁以上多く発現していることが分かった。

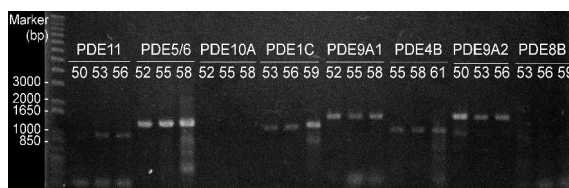


図6 各PDEでの最適アニーリング温度の推定

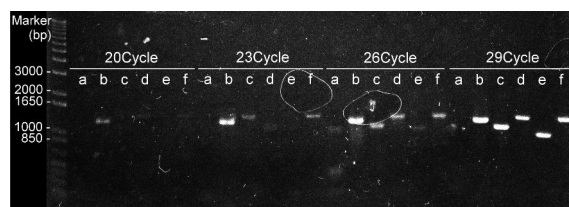


図7 各PDEの相対的定量化

さらに、Thermal Cycler Dice Real Time System II(Takara)により、qPCRをおこなった。qPCRにおいてもPDE5/6が他のタイプのPDEに比べ視細胞で発現量が多いことが示された(図8)。

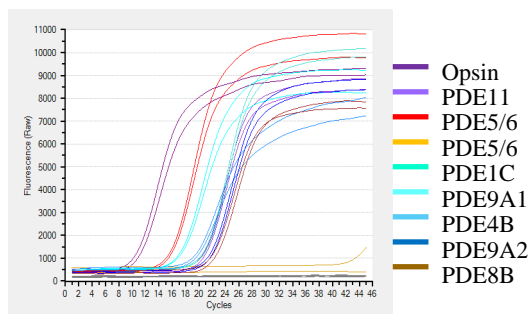


図8 qPCRの蛍光強度変化

PDE5/6が幼生視細胞特異的に発現しているかを、*in situ hybridization*で確かめた。図9に示すように、アンチセンスプローブを用いた時、視細胞に局在するシグナルが観測された。コントロールのセンスプローブでは、シグナルは観測されなかった。これらの結果から、PDE5/6は視細胞特異的に発現しており、視細胞信号伝達系に関与している可能性が高いと思われる。そのことを証明するために、PDE5/6のノックダウン実験を行い、図1で示した Ca^{2+} イメージング法を用いて機能解析を行う。

脊椎動物視細胞のPDE6には、PDE γ サブユニットがPDEの阻害因子として働き、光信号が

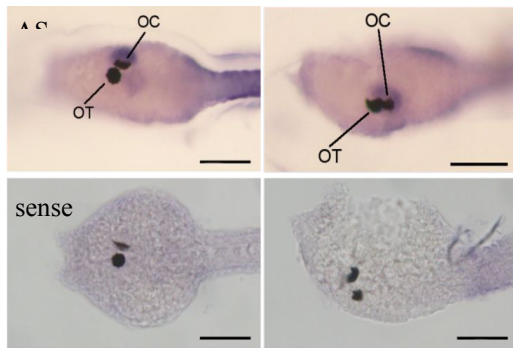


図9 PDE5/6 の in situ hybridization
アンチセンスプローブ(上) センス
プローブ(下)

OT: 耳胞 OC: 眼点

ない状態では、PDE γ が cGMP 分解活性をもつ PDE α /PDE β ヘテロ二量体に結合して、その活性を阻害している。ロドプシンが光信号を受容すると G タンパクを活性化し、活性型 G α が PDE γ に結合して、その PDE 抑制作用を阻害することで、PDE が活性化し cGMP の分解される。PDE γ は、光信号伝達系に重要な働きをしている。ホヤのゲノムデータベースを探索したところ、PDE γ に相同な遺伝子は見つからなかった。サイズが小さいので、ヒットしなかった可能性があるため、縮重プライマーを設計して、PCR を行った。様々な条件で PCR を行ったが、予想されるバンドは得られなかった。ホヤには、PDE γ が存在しない可能性が高い。ホヤ視細胞では、どのようにして光伝達系が制御されているか興味深い。ホヤ視細胞では、PDE δ が大量に発現している。このサブユニットが光信号伝達系に関与しているのかもしれない。今後は、このサブユニットの働きも調べていきたい。

<引用文献>

- Hardie RC.(2001): "Phototransduction in *Drosophila melanogaster*" *J Exp Biol.* **204**, :3403-9.
- Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D. and Philippe H (2006). "Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates." *Nature* **439**, 965-8.
- Gorman AL, McReynolds JS, and Barnes SN (1971): "Photoreceptors in primitive chordates: fine structure, hyperpolarizing receptor potentials, and evolution." *Science* **172**, 1052-4.
- Eakin RM and Kuda A (1971). "Ultrastructure of sensory receptors in Ascidian tadpoles." *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **112**, 287-312.
- Horie T, Orii H and Nakagawa M (2005): Structure of ocellus photoreceptors in the ascidian *Ciona intestinalis* larva as revealed by an anti-arrestin antibody. *J Neurobiol.* **65**, 241-50
- Kusakabe T, Kusakabe R, Kawakami I,

- Satou Y, Satoh N and Tsuda M (2001). "Ci-opsin1, a vertebrate-type opsin gene, expressed in the larval ocellus of the ascidian *Ciona intestinalis*." *FEBS Lett* **506**, 69-72.
- Nakagawa M, Orii H, Yoshida N, Jojima E, Horie T, Yoshida R, Haga T and Tsuda M(2002). "Ascidian arrestin (*Ci-arr*), the origin of the visual and nonvisual arrestins of vertebrate." *Eur J Biochem* **269**, 5112-8.
- Zanetti L, Ristoratore F, Francone M, Piscopo S, Brown ER. "Primary cultures of nervous system cells from the larva of the ascidian *Ciona intestinalis*." *J. Neurosci Methods* **165**, 191-7 (2007)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- Katsumoto, S. Hatta K. and Nakagawa, M. : Brief hypo-osmotic shock causes test cell death, prevents neurula rotation, and disrupts left-right asymmetry in *Ciona intestinalis*. *Zool Sci.* **30**, 352-359 (2013) 査読有り
doi: <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.30.352>
- Okamoto, S., Nakagawa, M. and Hatta, K. "Stochastic Ca²⁺ Waves that Propagate Through the Neuroepithelium in Limited Distances of the Brain and Retina Imaged with GCaMP3 in Zebrafish Embryos." *Zool Sci.* **30**, 716-723 (2013) 査読有り
doi: <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.30.716>

〔学会発表〕(計 8 件)

- 中川将司、桑原健太、杉本健太郎 “ホヤ幼生視細胞の光伝達系の解析”ホヤ研究集会 (東京都文京区 筑波大学東京キャンパス 2014 10 月 14 日)
- 堀江 健生, 大倉 正道, 中井 淳一, 中川将司: ホヤ幼生の遊泳運動神経回路の in vivo Ca²⁺イメージング 第36回分子生物学会 (兵庫県神戸市 神戸国際会議場 2013 年 12 月 4 日)
- Katsumoto S., Hatta, K., Nakagawa M.: "Brief hypo-osmotic treatment on eggs disrupts the left-right asymmetry of the larvae in *Ciona intestinalis*." 第51回日本生物物理学会年会 (京都市 国立京都国際会館 2013 年 10 月 30 日)
- Horie, T., Ohkura, M., Nakai, J. Nakagawa, M.: "In vivo calcium imaging of neural circuit for swimming locomotion of the ascidian larva" 日本比較生理生化学会第35回大会 (兵庫県姫路市 イーグレひめじ 2013 年 7 月 13 日)
- 高井健太、八田公平、堀江健生、笹倉靖徳、中川将司: カタユウレボヤ幼生の神経ネットワーク日本動物学会第 83 回大会 (大阪府豊中市 大阪大学豊中キャン

パス 2012年 9月15日)

Nakagawa, M., Fukano, T., Horie, T., Sasakura, Y., Miyawaki, A.: Neuronal activity in *Ciona* embryo. 日本比較生理生化学会第34回大会(神奈川県葉山湘南国際村センター 2012年7月7日)

Nakagawa M., Fukano T., Horie T., Sasakura, Y. and Miyawaki, A. : Ca^{2+} imaging of *Ciona* larval muscles, photoreceptors and neurons. 6th International Tunicate Meeting (Montreal Canada McGill University, July 3-7, 2011)

Nakagawa M., Fukano T., Horie T., Sasakura, Y. and Miyawaki, A. : Physiological study of ascidian tail muscle. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (Aichi Nagoya Nagoya Congress Center July31-June5, 2011)

〔図書〕(計 2件)

「光と生命の事典」朝倉書店 2015年8月
発刊予定 No.127 光シグナル伝達(無脊椎動物)

「研究者が教える動物実験」共立出版
2015年8月発刊予定 コラム”ホヤってどんな生き物?”

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 将司 (NAKAGAWA Masashi)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科
・助教
研究者番号: 00212085

(4) 研究協力者

杉本 健太郎 (SUGIMOTO Kentaro)
桑原 健太 (KUWABARA Kenta)