

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770074

研究課題名（和文）脊椎動物新規紫外線受容タンパク質の機能発現メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of the molecular properties of vertebrate novel UV-absorbing proteins

研究代表者

山下 高廣（YAMASHITA TAKAHIRO）

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：50378535

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物に広く見られる光受容タンパク質 Opn5 グループについて、その分子特性を比較解析することを目的とした。Opn5 グループのうち、Opn5m と Opn5L2 はともに 11 シス型レチナールを結合し紫外光受容体を形成し全トランス型に光異性化することで活性化すること、非哺乳類 Opn5m と Opn5L2 は全トランス型レチナールを直接結合し光非依存的に活性化することがわかった。つまり、Opn5 はヒトを含んで脊椎動物共通の紫外光感受システムを提供するとともに、一部は光受容以外の生理機能に関わる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the molecular properties of Opn5 group which contains photoreceptive proteins widely distributed in vertebrates. We revealed that, among several subgroups of Opn5 group, Opn5m and Opn5L2 can bind 11-cis-retinal to form UV-sensitive pigments and photoisomerization into all-trans-retinal results in G protein activation. In addition, non-mammalian Opn5m and Opn5L2 can also directly bind all-trans-retinal to activate G protein without light irradiation. These data suggest that Opn5 proteins possibly provide the molecular basis for UV reception in vertebrates including humans and non-mammalian Opn5 proteins are also responsible for non-photoreceptive function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：動物生理化学、光受容

1. 研究開始当初の背景

動物はものの形や色を認識する色覚だけでなく、時刻や季節の認識など多様な情報を外界の光環境の変化から得ている。このような視覚・非視覚の光受容に関わる光受容タンパク質がロドプシンに代表されるオプシン類である。このオプシン類は、そのアミノ酸配列からいくつかのグループに分類できる。その中でも Opn5 グループは、ヒト・マウスのゲノムから 2003 年に初めて遺伝子が単離された。その後、ゲノム解析の進展と共に、

脊椎動物の Opn5 遺伝子は少なくとも 3 種類に分類でき、哺乳類は 1 種類（Opn5m）しか持たないが、非哺乳類では Opn5m 以外に 2 種類（Opn5L1、Opn5L2）を持つことがわかった。しかし、これらの分子特性や詳細な生体内局在についての報告はなされていなかった。

そこで研究代表者らは、Opn5 遺伝子を 3 種類もつニワトリを用いて、Opn5 の機能発現メカニズムを網羅的に解析することを目指した。まず、Opn5 の分子特性を明らかに

するため、Opn5m のリコンビナント体を培養細胞で得ることを行った。いくつかの条件を最適化することにより、タンパク質解析に足る量のリコンビナント体を得ることに成功した。そして、Opn5m は 11 シス型レチナールを結合し紫外部に吸収極大をもつ吸収スペクトルを示すことがわかった。また、光受容によりレチナールが全トランス型に異性化することで可視部に吸収極大のある安定な状態に変化し、この状態は光を受けて元の紫外部に吸収極大のある状態に戻る、いわゆる”bi-stability”の性質を示すこともわかった。また、これらの 2 状態のうち全トランス型レチナールを結合する状態で Gi 型 G タンパク質を活性化する能力を有することも明らかとなった。さらに、Opn5m の抗体を作製しニワトリでの発現部位を解析したところ、網膜のアマクリン細胞・神経節細胞に加えて、時刻や季節の認識に関わるとされる松果体・視床下部室傍器官に存在が確認できた。つまり、Opn5m はニワトリにおいてマルチな光受容に関わる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、他の生物種や他のサブタイプの Opn5 の分子特性や発現部位を解析することにより、新規紫外光受容タンパク質である Opn5 の機能発現メカニズムを網羅的に明らかにすることを目的とする。そして、Opn5 は多くの生物種で網膜だけでなく眼以外の器官に発現している可能性があるため、眼外紫外光受容の分子基盤について知見を得る。その結果から、動物の進化と紫外光受容との関わりについて議論する。

3. 研究の方法

オプシン類の分子特性については、培養細胞でリコンビナント体を最適化された条件により作製し、独自に開発した分光学的・生化学的手法等により解析を行った。

オプシン類の生体内での発現部位については、作製した特異的抗体を用いた免疫染色法、または *in situ hybridization* 法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 脊椎動物 Opn5m の解析

脊椎動物に広く見いだされる Opn5m について分子特性を詳細に比較するため、ニワトリに加えてヒト、マウス、カエル、ゼブラフィッシュの Opn5m のリコンビナント体を培養細胞で作製・精製した。その結果、すべてニワトリ Opn5m と同様に紫外光感受性であることがわかった。つまり、Opn5 は脊椎動物における紫外光受容の共通分子基盤を提供できることが示された。さらに分子特性を解析したところ、非哺乳類 Opn5m は 11 シ

ス型レチナールを結合し紫外光受容で活性化する以外に、全トランス型レチナールを直接結合し光とは関係なく活性化する一方、哺乳類 Opn5m はその能力を失っていた。さらにこの全トランス型レチナールの直接結合能の喪失は、1 アミノ酸の変化によりなされていることがわかった。つまり、哺乳類 Opn5m は 1 アミノ酸変異により光受容体に特化していると考えられた。今後、哺乳類における Opn5m の分子特性の変化と生体内発現部位、生理機能との関わりについての解析により、哺乳類や霊長類における紫外光感受システムの意義について理解が進むと期待できる。

(2) ニワトリ Opn5L1 の解析

哺乳類以外の脊椎動物に広く見いだされる Opn5L1 について、ニワトリのものの分子特性の解析を行った。結合するレチナール異性体を調べたところ、多くのオプシン類が結合する 11 シス型を結合せず全トランス型のみを結合した。さらに、この全トランス型レチナールの結合により光とは関係なく G タンパク質を活性化し、光受容によりその活性が減少することがわかった。つまり、Opn5L1 は光によって活性化されずレチナール結合という化学受容によってのみ活性化されると考えられた。オプシン類において光以外の刺激によってのみ活性化される受容体は非常に特異な存在であり、生理機能との関わりが今後の研究の対象となる。

(3) ニワトリ Opn5L2 の解析

哺乳類以外の脊椎動物に広く見いだされる Opn5L2 について、ニワトリのものの分子特性の解析を行った。Opn5m 同様に、11 シス型レチナールを結合し紫外光受容体を形成し、全トランス型レチナールを含む可視光受容状態に光変換した後 G タンパク質を活性化することがわかった。また、全トランス型レチナールを直接結合し光とは関係なく G タンパク質を活性化することができ、その効率は Opn5m よりも高いものであった。さらに、ニワトリ Opn5L2 は、網膜のアマクリン細胞・神経節細胞、視床下部の一部、副腎に発現することを見いだした。これらの組織の中には光受容器官とは考えられないものもあり、全トランス型レチナールを直接結合できる能力を利用して、光受容以外の機能に関わる可能性が考えられた。実際、光受容以外のどのような生理機能に関わるのか解析することが、今後の研究の対象となる。

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 10 件、すべて査読有り)

1. M. Yanagawa, T. Yamashita and Y.

- Shichida (2013) Glutamate acts as a partial inverse agonist to metabotropic glutamate receptor with a single amino acid mutation in the transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* 288, 9593-601, DOI: 10.1074/jbc.M112.437780
2. T. Yamashita, S. Nakamura, K. Tsutsui, T. Morizumi and Y. Shichida (2013) Chloride-dependent spectral tuning mechanism of L-group cone visual pigments. *Biochemistry* 52, 1192-7, DOI: 10.1021/bi3016058
 3. H. Ueyama, S. Muraki-Oda, S. Yamade, S. Tanabe, T. Yamashita, Y. Shichida and H. Ogita. (2012) Unique haplotype in exon 3 of cone opsin mRNA affects splicing of its precursor, leading to congenital color vision defect. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 424, 152-7, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.094
 4. T. Matsuyama, T. Yamashita, Y. Imamoto and Y. Shichida (2012) Photochemical properties of mammalian melanopsin. *Biochemistry* 51, 5454-62, DOI: 10.1021/bi3004999
 5. K. Sato, T. Yamashita, Y. Imamoto and Y. Shichida (2012) Comparative studies on the late bleaching processes of four kinds of cone visual pigments and rod visual pigment. *Biochemistry* 51, 4300-8, DOI: 10.1021/bi3000885
 6. N. Kimata, T. Yamashita, T. Matsuyama, Y. Imamoto and Y. Shichida (2012) The C-terminus of the G protein α subunit controls the affinity of nucleotides. *Biochemistry* 51, 2768-74, DOI: 10.1021/bi201702d
 7. H. Ohuchi, T. Yamashita, S. Tomonari, S. Fujita-Yanagibayashi, K. Sakai, S. Noji and Y. Shichida. (2012) A non-mammalian type opsin 5 functions dually in the photoreceptive and non-photoreceptive organs of birds. *PLoS One* 7, e31534, DOI: 10.1371/journal.pone.0031534
 8. K. Sakai, Y. Imamoto, C.Y. Su, H. Tsukamoto, T. Yamashita, A. Terakita, K.W. Yau and Y. Shichida. (2012) Photochemical nature of parietopsin. *Biochemistry* 51, 1933-41, DOI: 10.1021/bi2018283
 9. K. Sato, T. Yamashita, H. Ohuchi and Y. Shichida (2011) Vertebrate ancient-long opsin has molecular properties intermediate between those of vertebrate and invertebrate visual pigments. *Biochemistry* 50, 10484-90, DOI: 10.1021/bi201212z
 10. M. Yanagawa, T. Yamashita and Y. Shichida (2011) Comparative fluorescence resonance energy transfer analysis of metabotropic glutamate receptors: implications about the dimeric arrangement and rearrangement upon ligand bindings. *J. Biol. Chem.* 286, 22971-81, DOI: 10.1074/jbc.M110.206870
- [学会発表]
招待講演等 (計 3 件)
1. T. Yamashita : 「Molecular properties of vertebrate non-visual opsins, Opn5 and Opn5-like protein」 15th International Conference on Retinal Proteins (2012,3rd,Oct., Ascona/Switzerland)
 2. T. Yamashita : 「What should we learn from animal opsin diversification?」 第 49 回日本生物物理学会年会シンポジウム (2011,17th,Sep., 兵庫県立大/兵庫県)
 3. T. Yamashita : 「Functional evolution of opsins」 第 13 回日本進化学会年会シンポジウム (2011,30th,Jul., 京都大/京都府)
- その他学会発表 (計 2 2 件)
1. K. Kojima, R. Maeda, Y. Imamoto, T. Yamashita and Y. Shichida : 「Comparative analysis of transducin activation by rhodopsin and cone pigments in nanodiscs」 日本生物物理学会第 50 回年会 (2012,22th,Sep., 名古屋大/愛知県)
 2. T. Yamashita, H. Ohuchi, S. Tomonari, S. Fujita-Yanagibayashi, K. Sakai, S. Noji and Y. Shichida : 「Analysis of molecular properties of vertebrate non-visual opsins, Opn5 and Opn5-like protein」 日本生物物理学会第 50 回年会 (2012,22th,Sep., 名古屋大/愛知県)
 3. M. Yanagawa, T. Yamashita and Y. Shichida : 「Single amino acid substitution in the transmembrane domain of metabotropic glutamate receptor changes an agonist into an inverse agonist」 日本生物物理学会第 50 回年会 (2012,22th,Sep., 名古屋大/愛知県)
 4. 山下高廣・大内淑代・友成さゆり・柳林 (藤田) 彩理・酒井佳寿美・野地澄晴・七田芳則 : 「非哺乳類脊椎動物が持つ光受容タンパク質 Opn5L2 の解析」 日本動物学会第 83 回大会 (2012,13th,Sep., 大阪大/大阪府)
 5. 佐藤恵太・山下高廣・大内淑代・友成さゆり・湯本茜・柳林 (藤田) 彩理・酒井佳寿美・野地澄晴・七田芳則 : 「非哺乳類脊

- 椎動物が持つ光受容タンパク質 Opn5L1 の分子特性解析」日本動物学会第 83 回大会 (2012,13th, Sep., 大阪大/大阪府)
6. 湯本茜・山下高廣・大内淑代・友成さゆり・野地澄晴・七田芳則：「新規 Opn5 類似タンパク質の分子特性解析」日本動物学会第 83 回大会 (2012,13th, Sep., 大阪大/大阪府)
 7. 松山オジョス武・山下高廣・今元泰・七田芳則：「マウスメラノプシンの光応答特性」日本動物学会第 83 回大会 (2012,13th, Sep., 大阪大/大阪府)
 8. 山下高廣・大内淑代・友成さゆり・柳林 (藤田) 彩理・酒井佳寿美・野地澄晴・七田芳則：「脊椎動物非視覚オプシン Opn5 と類似タンパク質の比較解析」第 16 回視覚科学フォーラム (2012,25th, Aug., 埼玉医科大/埼玉県)
 9. 山下高廣・大内淑代・友成さゆり・柳林 (藤田) 彩理・酒井佳寿美・野地澄晴・七田芳則：「非哺乳類特異的なオプシン 5 類似光受容タンパク質の解析」動物学会近畿支部春季発表会 (2012,12th, May, 奈良女子大/奈良県)
 10. 湯本茜・山下高廣・酒井佳寿美・友成さゆり・大内淑代・七田芳則「脊椎動物光受容タンパク質 Opn5 の分子特性に関する比較解析」日本動物学会第 82 回大会 (2011,22nd, Sep., 旭川市大雪クリスタルホール/北海道)
 11. 山下高廣・大内淑代・友成さゆり・柳林 (藤田) 彩理・酒井佳寿美・野地澄晴・七田芳則：「非哺乳類が持つ Opn5 類似光受容タンパク質の分子特性解析」日本動物学会第 82 回大会 (2011,22nd, Sep., 旭川市大雪クリスタルホール/北海道)
 12. 澤登悠子・柳川正隆・山下高廣・七田芳則「脊椎動物視物質のアポタンパク質“オプシン”における G タンパク質活性化能の比較解析」日本動物学会第 82 回大会 (2011,21st, Sep., 旭川市大雪クリスタルホール/北海道)
 13. 佐藤恵太・森住威文・山下高廣・今元泰・七田芳則「長波長感受性錐体視物質に結合した塩化物イオンは活性状態の生成を促進する」日本動物学会第 82 回大会 (2011,21st, Sep., 旭川市大雪クリスタルホール/北海道)
 14. K. Kojima, R. Maeda, I. Seki, T. Yamashita, Y. Imamoto and Y. Shichida : 「Analysis of photobleaching processes of rhodopsin and cone pigments in nanodiscs」日本生物物理学会第 49 回年会 (2011,16th, Sep., 兵庫県立大/兵庫県)
 15. K. Sakai, Y. Imamoto, T. Yamashita and Y. Shichida : 「Exploring the molecular function of Parietopsin」日本生物物理学会第 49 回年会 (2011,16th, Sep., 兵庫県立大/兵庫県)
 16. N. Kimata, T. Yamashita, T. Matsuyama, H. Y. Imamoto and Y. Shichida 「G protein activation mechanism by activated rhodopsin」日本生物物理学会第 49 回年会 (2011,16th, Sep., 兵庫県立大/兵庫県)
 17. M. Yanagawa, T. Yamashita and Y. Shichida : 「Dimeric arrangement of metabotropic glutamate receptor and its synergistic rearrangement upon the binding of two glutamates」日本生物物理学会第 49 回年会 (2011,16th, Sep., 兵庫県立大/兵庫県)
 18. K. Sato, T. Yamashita and Y. Shichida : 「Molecular characterization of vertebrate ancient-long opsin」5th Asia and Oceania Conference on Photobiology (2011,31th, Jul, 奈良県新公会堂/奈良県)
 19. N. Kimata, T. Yamashita, T. Matsuyama, Y. Imamoto and Y. Shichida : 「Direct interlink between C-Terminus of G Protein and its nucleotide-binding site」5th Asia and Oceania Conference on Photobiology (2011,31th, Jul, 奈良県新公会堂/奈良県)
 20. T. Matsuyama, T. Yamashita, Y. Imamoto and Y. Shichida : 「Characterization of ligand induced and constitutive activity in rhodopsin」5th Asia and Oceania Conference on Photobiology (2011,31th, Jul, 奈良県新公会堂/奈良県)
 21. T. Yamashita, H. Ohuchi, S. Tomonari, K. Ikeda, K. Sakai and Y. Shichida : 「Opn5 is a UV-sensitive bistable pigment that couples with Gi subtype of G protein」FASEB Conference “Biology & Chemistry of Vision” (2011,22nd, Jun., Tucson/USA)
 22. 佐藤恵太・山下高廣・大内淑代・七田芳則：「アフリカツメガエル VAL オプシンの解析」動物学会近畿支部春季発表会 (2011,14th, May, 京都大/京都府)
- 〔図書〕 (計 3 件)
1. Y. Shichida, T. Yamashita, H. Imai and T. Kishida (2013) Evolution and Senses, Springer (p.1-22).
 2. 七田芳則、山下高廣 (2012) 「多様な光環境への動物の適応メカニズム」 「生き物たちのつづれ織り上」京都大学学術出版会 (p.154-163).
 3. 山下高廣 (2011) 「脊椎動物新規紫外光受容タンパク質～ヒトも紫外線を感じる？

～」 生物物理, 51, 186-7.

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

http://photo1.biophys.kyoto-u.ac.jp/shichida/home_jp.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 高廣 (YAMASHITA TAKAHIRO)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：50378535

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし