

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：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657052

研究課題名(和文)非視覚性の光受容ニューロンにおけるオプシンの機能分化と新たな光シグナリング経路

研究課題名(英文)Biochemical and genetic dissection of photoreceptor proteins and their signaling pathway in the non-visual photoreceptor neurons

研究代表者

小島 大輔(KOJIMA, Daisuke)

東京大学・理学系研究科・講師

研究者番号：60376530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：概日時計を明暗サイクルに同調させる「概日光受容」は、様々な動物において見出される普遍的な機能である。哺乳類の概日光受容は網膜の光感受性神経節細胞ipRGCが担うが、私どもの研究成果から、ipRGCの光受容蛋白質OPN4が新たなシグナル伝達経路を駆動する可能性が浮かび上がってきた。本研究では、この新規シグナル経路に關与するGタンパク質を同定するとともに、このシグナル経路の光活性化をipRGCにおいて検出する実験系の構築を進めた。

研究成果の概要(英文)：A variety of animals have an intrinsic circadian clock that can be entrained by environmental light-dark cycles through circadian photoreception system. Mammalian circadian photoreception is mediated by intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, ipRGCs, in the retina. Our previous study suggests that the ipRGC photoreceptor protein, OPN4, triggers a novel signaling pathway. In this study, we identified a subtype of heterotrimeric G-protein mediating the novel OPN4 signaling. We also established the transgenic mouse lines to detect the OPN4 signaling in the ipRGCs by using bioluminescent reporter system.

研究分野：光生物学・感覚分子生理学

キーワード：オプシン 神経科学 シグナル伝達 光生物学 網膜 概日時計 ipRGC OPN4

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物は、光を映像として捉える視覚機能とは別に、周囲の明暗に応答して多様な生理現象を引き起こす『非視覚性』の光受容機能をもつ。中でも、地球の自転と公転によって作り出される明暗サイクルに反応して、体内の概日時計を同調させる「概日光受容」は、様々な動物において見出される普遍的な機能である。哺乳類の場合、行動リズムを制御する「時計中枢」は視床下部の微小な神経核（視交叉上核）に存在し、網膜で受容された光情報により位相制御を受ける。この概日光受容に中心的な役割を担うのが、内在性の光感受性をもつ網膜神経節細胞 (ipRGC) である。ipRGC は、光受容蛋白質 OPN4 (メラノプシン) をもち、時計中枢の視交叉上核に投射する。

ipRGC の光受容に OPN4 が必須であることはわかっているが、OPN4 のシグナリング経路は ipRGC の発見から 10 年以上経過したにも拘らず未だ同定されていない。例えば、*in vitro* 再構成実験などの人工的な実験系においては、OPN4 が光依存的に Gq 型の G タンパク質を活性化しうることが報告されている [Koyanagi *et al.* 2005 など] が、生体内の ipRGC において OPN4 がどのような G タンパク質に光シグナルを伝達するかは明らかになっていない。実際、2 種類の Gq 型 G タンパク質 α サブユニット (Gaq, Ga11) の double KO マウスにおいて、行動リズムの光同調に異常は見られず、また、ipRGC の光感受性も正常に保持されることが報告されている [Brown *et al.* 2009]。一方私どもは最近、HEK293 細胞に異所発現させた OPN4 が、Gq 型 G タンパク質を介さないシグナリング経路を光依存的に活性化することを見出している [未発表データ、図 1]。ipRGC において OPN4 が新規の光シグナリング経路を駆動し、さらにこの経路が概日時計の光制御に何らかの役割を担っていることが示唆されている。

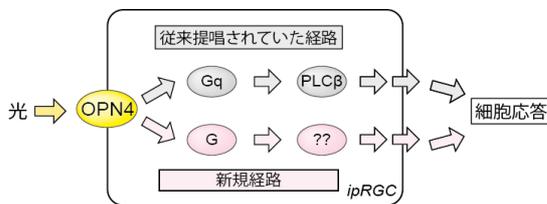


図 1: ipRGC における光シグナリング

(2) 哺乳類以外の脊椎動物に目を向けると、多くの脊椎動物は 2 種類の *Opn4* 遺伝子 (*Opn4-1* および *Opn4-2*) をもつ。この二種類の遺伝子の重複は、脊椎動物の共通祖先の段階で生じたと推測され、哺乳類は例外的にこのうち片方 (*Opn4-1*) を失っている [Bellingham *et al.* 2006]。また私どもは、これら二種類の *Opn4* 遺伝子がいずれも青色光受容体をコードすることを、ニワトリ松果体に発現する OPN4 の研究から明らかにし

た [Torii *et al.* 2007]。しかし、なぜ脊椎動物は二種類の *Opn4* の重複遺伝子を保持しているのか、また、二種類の OPN4 タンパク質にどのような機能的な相違があるのか、については謎のままであった。私どもは最近、両者が互いに異なる光反応を示すことを明らかにした [未発表データ、図 2]。すなわち、OPN4-1 は光活性化した後、すぐに褪色して不活性化するが、一方の OPN4-2 は光活性化した状態が安定して持続し、かつ活性化状態と不活性化状態とが刺激光の波長に依存して切り替わる。このような機能的相違は、分子レベルのみならず、細胞・個体のレベルでの光応答性の違いに結びつく可能性がある。

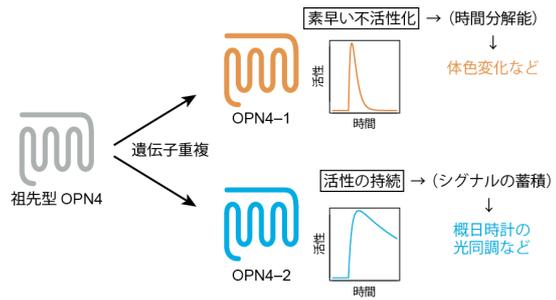


図 2: *Opn4* の機能分化

2. 研究の目的

(1) これまで提唱されていた Gq シグナリング経路とは異なる、OPN4 の新規シグナリング経路の存在が示唆されている。本研究においては、ipRGC の光シグナリングにおけるこの経路の存在を明らかにするとともに、ipRGC における役割を検証する。

(2) ニワトリ由来の 2 種類の *Opn4* 重複遺伝子 (*Opn4-1* および *Opn4-2*) が互いに異なる光応答を引き起こすことを、培養細胞において見出している。本研究では、OPN4 蛋白質の多様性にどのような生理的意義があるのかを、遺伝子組換えマウス等を用いて検証し、「哺乳類はなぜ *Opn4-2* 遺伝子のみを残したのか」という進化的な疑問に答える。

3. 研究の方法

(1) OPN4 の光応答を細胞レベルで検出するため、HEK293 細胞に *Opn4* 遺伝子と発光レポーター遺伝子を共発現させ、OPN4 の発色団である 11 シス型レチナールならびに発光レポーターの基質を添加した後に、細胞からの発光を連続記録した。また、OPN4 の光シグナリングを個体レベルで検証するため、遺伝子改変マウスの作製と交配を行った。具体的には、*Opn4* 遺伝子のプロモーターの制御下で Cre 組換え酵素を発現するマウス系統、Cre 発現細胞特異的に G 蛋白質 α サブユニット遺伝子をノックアウトするマウス系統、Cre 発現細胞特異的に発光レポーターを発現するマウス系統を用いた。

(2) 2 種類の OPN4 の間で、G 蛋白質活性化

能に違いがあるのかどうかを検証するため、生化学アッセイを行った。培養細胞に OPN4 を強制発現・再生させて精製した膜面分を OPN4 試料とした。この試料を、マウス網膜から精製した Gt もしくは昆虫細胞 Sf9 に強制発現させて精製した Gq (奈良先端科学技術大学院大学・伊東広教授のグループとの共同研究) と混合し、光を照射して GTP アナログの取り込み量を定量することにより、G 蛋白質の活性化量を測定した。また、個体レベルにおける 2 種類の OPN4 の生理的役割を検証するため、遺伝子改変マウスを作製した。

4. 研究成果

(1) 哺乳類の概日光受容は網膜の光感受性神経節細胞 ipRGC が担うが、私どもの研究成果から、ipRGC の光受容蛋白質 OPN4 が新たなシグナル伝達経路を駆動する可能性が浮かび上がってきた。そこでまず、発光レポータ遺伝子を発現する培養細胞をモデル系として、OPN4 シグナルを担う候補因子群について、それぞれの機能阻害実験を行った。このうち候補 G 蛋白質サブタイプについては、当初計画していた薬理的阻害が困難であることが判明した。そこで分子遺伝学的な手法 (RNAi) を用いた実験系に切り替えて機能阻害実験を行ったところ、この G 蛋白質サブタイプが OPN4 により光活性化されることが強く示唆された。さらにこのシグナル伝達経路を個体レベルで解析するため、マウス Opn4 遺伝子プロモーター制御と Cre/loxP システムを利用し、この G 蛋白質サブタイプの α サブユニット遺伝子を ipRGC 特異的にノックアウトする遺伝子組換えマウスの作製を進めた。今後このマウスの行動解析を進めることにより、このシグナル伝達経路の概日光受容における役割を個体レベルで明らかにできると期待される。

また、このシグナリング経路が ipRGC において実際に作動しているかどうかを明らかにするために、ウイルスベクター等を用いてレポータ遺伝子 (ルシフェラーゼ改変体) を ipRGC に一過的に導入することを試みた。この発光レポータは、上述のシグナル経路の二次メッセンジャーを検出する。その結果、この手法では、OPN4 シグナリングを発光イメージングにより検出するためにはレポータ遺伝子の導入効率が不十分であることが分かった。そこで、マウス Opn4 遺伝子プロモーター制御と Cre/loxP システムを利用し、発光レポータ遺伝子を ipRGC 特異的かつ高効率で発現するトランスジェニックマウスの作製を進めた。その結果、複数のマウス系統を樹立することに成功したが、いずれもレポータ遺伝子の発現量が低く、この経路の活性化を検出するには不十分であることがわかった。現在この問題を解決するため、新たなマウス系統を作製し、OPN4 シグナリング解析系の構築を進めている。

(2) 多くの脊椎動物は 2 種類の Opn4 重複遺伝子 (Opn4-1 および Opn4-2) をもち、私どもの研究から両者が互いに異なる光反応を示すことが明らかになっている (「研究開始当初の背景」を参照)。ニワトリの松果体には両方のタイプの Opn4 が発現しており、かつ、光情報伝達を担う G 蛋白質の候補として、Gt と G₁₁ (Gq サブタイプの 1 つ) が同定されている。そこで、Opn4 重複遺伝子の機能分化を G 蛋白質活性化の面から理解するため、OPN4 蛋白質と G 蛋白質との生化学アッセイを行った。その結果、OPN4-1 は光依存的に Gq を活性化する一方で Gt を活性化せず、対照的に OPN4-2 は Gt を活性化するが Gq を活性化しないことが明らかとなった。さらに OPN4-2 は、蛋白質発現に用いた培養細胞から混入してきた G 蛋白質を光活性化することも明らかになり、Opn4 の重複遺伝子の間では共役する G 蛋白質サブタイプの選択性にも違いがあると結論された【論文投稿中】(図 3)。

哺乳類は例外的に 2 種類の Opn4 重複遺伝子のうち片方 (Opn4-1) を失っている。Opn4 重複遺伝子の機能分化がどのような生物学的意義を持つのかを検証するため、組換え酵素 Cre 存在下でニワトリ cOpn4-1 もしくは cOpn4-2 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (cOpn4-1 Tg および cOpn4-2 Tg) 系統を樹立した。これらの系統と、ipRGC 特異的に Cre を発現する組換え系統との交配を行い、ipRGC 特異的に cOpn4-1 もしくは cOpn4-2 を発現するマウスを作成した。

さらに、これら 2 種類の Opn4 重複遺伝子を共に保持する動物モデルとして、ゼブラフィッシュを用いた研究を開始した。ゼブラフィッシュの非視覚性の光生理現象 (体色変化) を対象に OPN4 阻害剤を用いた実験を行ったところ、Opn4 重複遺伝子の何れかが光制御に関与することを見出した。今後ゼブラフィッシュの遺伝子組換え技術を用いて、この光生理現象における Opn4 重複遺伝子群の寄与を詳細に解析することにより、脊椎動物ゲノムに 2 種類の Opn4 重複遺伝子が存在することの生物学的意義を明らかにしたい。

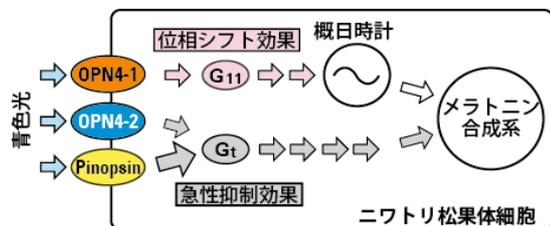


図 3: ニワトリ松果体における G 蛋白質シグナリング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. 小島大輔, 深田吉孝 脳内光受容体。分子精神医学 14, 291-293 (2014). 【査読なし】

- David Kokel, Timothy W. Dunn, Misha B. Ahrens, Rüdiger Alshut, Chung Yan J. Cheung, Louis Saint-Amant, Giancarlo Bruni, Rita Mateus, Tjakko J. van Ham, Tomoya Shiraki, Yoshitaka Fukada, Daisuke Kojima, Jing-Ruey J. Yeh, Ralf Mikut, Johannes von Lintig, Florian Engert, Randall T. Peterson. Identification of non-visual photomotor response cells in the vertebrate hindbrain. *J. Neurosci.* **33**, 3834-3843 (2013)
doi: 10.1523/JNEUROSCI.3689-12.2013
【査読あり】

〔学会発表〕

(計 20 件：うち主要な 6 件を以下に記載)

- Daisuke Kojima: Photoreceptors regulating background adaptation in zebrafish. *The 16th International Conference on Retinal Proteins*, 長浜ロイヤルホテル (滋賀), October 8, 2014. 【招待講演】
- Daisuke Kojima: Photoreceptors regulating light-induced body color change in zebrafish. *The 11th International Congress of Neuroethology*, 札幌コンベンションセンター (北海道), July 30, 2014. 【招待講演】
- 小島大輔 動物の背地適応を制御する光受容分子の探索。分子研研究会「ロドプシン研究の故きを温ねて新しきを知る」, 岡崎コンファレンスセンター (愛知), 2013 年 11 月 18 日 【招待講演】
- Daisuke Kojima: Photic regulation of body colour in zebrafish. *The 6th Asia & Oceania Conference on Photobiology*, Sydney (Australia), November 11, 2013. 【招待講演】
- Daisuke Kojima, Ikuko Sumikawa, Sho Matsumoto, Tomoya Shiraki, Yoshitaka Fukada: Color sensitivity of light-induced body color change in larval zebrafish. *FASEB Summer Research Conference: The Biology and Chemistry of Vision*, Steamboat Springs (USA), June 13, 2013. 【招待講演】
- Daisuke Kojima: OPN5, a photosensory protein for mammalian ultraviolet photoreception. The 12th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology, ヒルトン福岡シーホーク(福岡), July 9, 2012. 【招待講演】

〔図書〕 (計 6 件)

- 小島大輔 体色変化。「動物の事典」 (末光隆志ほか編, 朝倉書店), 印刷中.
- 小島大輔 体色変化。「光と生命の事典」 (日本光生物学協会 編, 朝倉書店), 印刷中.

- 小島大輔, 深田吉孝 ロドプシン遺伝子の発現を GFP で見る～ゼブラフィッシュ受精卵への DNA 微量注入。研究者が教える動物実験 第 1 巻「感覚」(日本比較生理生化学会 編, 共立出版), 印刷中.
- Daisuke Kojima, Yoshitaka Fukada: Molecular mechanisms of the function of pineal organs. in “*Vertebrate Photoreceptors: Functional Molecular Bases*” (T. Furukawa, J. B. Hurley, S. Kawamura, eds.) Springer Japan, Tokyo, Japan; pp 327-341 (2014)
- 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).
- 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).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/fukada-lab/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 大輔 (Daisuke Kojima)

東京大学・大学院理学系研究科・講師

研究者番号：60376530