

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25251036

研究課題名(和文) Opn5の分子特性と機能の探索

研究課題名(英文) Molecular and functional properties of Opn5

研究代表者

七田 芳則 (Shichida, Yoshinori)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60127090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,400,000円

研究成果の概要(和文)：動物の光受容に関与するオプシン類は、分子進化の過程で様々な多様化し、新奇な光受容機能獲得に寄与している。我々は、独自に研究を始めたOpn5グループが、脊椎動物の中で4つのサブグループに分かれ、紫外光、可視光感受性の光受容体から、光受容によってGタンパク質活性を失う逆光受容体にまで多様化していることを発見した。また、Opn5の組織内局在を検討し、遺伝子改変メダカを作製した結果、これまでにメカニズムが謎であった光受容機能に関与する可能性を見いだした。さらに、Opn5グループと同様に多様化している視覚オプシンのグループについて、分子特性やそれに関与するアミノ酸残基の同定を行った。

研究成果の概要(英文)：Animal photoreceptor proteins, opsins, have been widely diversified to acquire various new physiological functions in the course of molecular evolution. In this study, we have investigated the molecular properties of opsins in Opn5 group, one of the opsin groups that was most recently discovered in mammals, and found that they were diversified into not only UV- and visible-light absorbing receptors but also a reverse photoreceptor that loses G protein activation activity by light. We have also investigated localizations of Opn5 in eyes and brain and explored their functions by generating knock-out medaka fishes. The results indicated that some of the Opn5 subgroups would be responsible for uncharacterized physiological functions. Furthermore, we have investigated the molecular properties of opsins diversified in the vertebrate visual opsin group to obtain insights into molecular mechanisms underlying diversification in Opn5 group.

研究分野：分子生理学

キーワード：光受容体 オプシン 機能多様性 分子メカニズム モデル動物

1. 研究開始当初の背景

動物の光応答に關与するオプシン類は、分子進化の過程で様々に多様化し、多くの生理機能に關与している。ヒトは9種類のオプシン遺伝子を持ち、そのうちの4種類は視覚（暗所視、明所視・色覚）に關与するオプシンである。他の5種類は、瞳孔反射や概日リズムのリセットなど、視覚以外の光受容に關与するオプシンで、非視覚オプシンと呼ばれている。これら非視覚オプシンのうち、最後に遺伝子が同定され分子特性が未解明で残っていたのが本研究課題の Opn5 である。申請者らは2010年にニワトリの Opn5（現在では Opn5m）を実験材料として培養細胞系でのリコンビナント体の発現に初めて成功し、それが Gi 共役型の紫外光受容体であることを報告した。その後、ゼブラフィッシュ、ゼノパス、マウス、ヒトの Opn5m のリコンビナント体の作製を行い、これらが紫外光感受性のオプシンであることを確認した。さらに、脊椎動物のゲノムから Opn5 グループに含まれる遺伝子を探索して分子系統樹を作成するとともに、このグループの約30種についてリコンビナント体の作製とスペクトル的性質を検討した。その結果、脊椎動物の Opn5 は4つのサブグループ（Opn5n、Opn5m、Opn5L2、Opn5L1）に分けられ、各サブグループそれぞれが特徴的なスペクトル特性をもつことを見いだした

2. 研究の目的

我々は Opn5 グループが4つのサブグループに分岐し、可視光・紫外光の受容体から、オプシン類にもかかわらず全トランス型のレチナルとのみ結合するグループにまで多様化していることを明らかにした。そこで、本研究ではこれら Opn5 の分子特性を詳細に検討するとともに、分子特性の多様化をもたらすアミノ酸残基を特定することを試みた。また、発現部位や遺伝子改変動物の解析から Opn5 の生理機能を明らかにすることを試みた。さらに、Opn5 グループと、研究が進んでいる脊椎動物の視覚オプシングループとの分子特性の比較解析を試みた。

3. 研究の方法

- 1) Opn5 グループの種々のオプシンの遺伝子を培養細胞系で発現させ、リコンビナント体を作製した。また、それらの変異体も同様の方法で作製した。そして、それらの分子特性を生化学的・分光学的手法を用いて検討した。
- 2) Opn5 のそれぞれのサブグループの遺伝子について、mRNA やタンパク質の局在を、in situ hybridization、および、免疫組織化学的手法を用いて検討した。
- 3) Opn5 遺伝子をノックアウトしたモデル動物の作製を試み、Opn5 の生理機能の解析を試みた
- 4) 視覚オプシングループのオプシンについて、リコンビナント体を作製し、Opn5 グループ

プのオプシンとの分子特性の違いを生化学的・分光学的手法を用いて検討した。

4. 研究成果

1) Opn5m グループ：申請者らは2010年にニワトリの Opn5m のリコンビナント体の作製に成功し、Opn5m が Gi 共役型の紫外光受容体であることを報告した。その後、ヒトを含む多くの脊椎動物の Opn5m について、それらの分子特性を検討した。その結果、魚類から鳥類までの Opn5m は11シスレチナルと結合して紫外光受容体として機能するが、全トランスレチナルとも結合する能力を持ち、化学受容体としても機能することがわかった。一方、ほ乳類および霊長類の Opn5m は11シスレチナルとのみ結合することができ、紫外光受容体としてのみ機能することがわかった。また、変異体解析により、ほ乳類の Opn5m の分子特性は N 末端から168番目のアミノ酸残基の変異により獲得されたことを発見した。さらに興味深いことに、純粋な紫外光受容体となったほ乳類の Opn5m が、眼以外では視床下部に発現していることを、マウスおよびマーモセットで発見した。これは霊長類の脳内で発現部位を確認した初めてのオプシンである。

一方、条鰭類の中には、これまでに知られている Opn5m の他にアミノ酸配列の相同性の高いもう一つの遺伝子のあることがわかった。この遺伝子から生成するオプシン（Opn5m2）は紫外光受容体であり、分子特性は Opn5m とよく似ていた。また、眼・脳における局在を Opn5m および Opn5m2 について検討した結果、種によってかなりの多様性のあるものの、広範な細胞で発現していることがわかった。つまり、魚類では多くの細胞で紫外光を感受し、非視覚機能に利用している可能性が考えられた。

2) Opn5L1 グループ：Opn5L1 は Opn5 グループの中でも特徴的な分子特性を示す。すなわち、暗中で11シスレチナルとは結合せず、全トランスレチナルとのみ結合して活性状態になる。つまり、Opn5L1 は、全トランスレチナルをアゴニストとする Gi 共役型受容体として機能する。しかし、全トランスレチナルと結合した Opn5L1 は可視光を受容することができ、受容すると全トランスレチナルが11シスレチナルへと光異性化し、その後、レチナルが近くに存在するシステム残基と1,6アダクト反応を起こし、可視部および近紫外部に吸収を持たない不活性状態に変化する。この状態は、その後、数時間の時定数で全トランスレチナルを持つ元の活性状態に変化する。以上のことから、Opn5L1 は光を受容しない状態で G タンパク質を活性化し、光を受容すると不活性状態に変化し、その後、熱反応によって元の活性状態に戻るといった分子特性を示す。この分子特性は、光で活性化される通常の光受容体

(Forward photoreceptor) に対して逆向きの光受容体 (Reverse photoreceptor) として機能することがわかった。O_{pn5L1} の機能を検討するために O_{pn5L1} の生体内での発現部位を *in situ* hybridization および免疫組織化学的に検討した。その結果、網膜での発現量が少ない一方、脳内のいくつかの部位において発現の特異的シグナルを見いだすことができた。さらに、遺伝子改変メダカを作製したところ、メダカの行動に影響を与えることがわかった。

3) O_{pn5n} グループ: O_{pn5n} は上記の2つのグループとは異なり、G_i 共役型の可視光受容体として機能する。つまり、暗中には11シスレチナルと結合して可視部に吸収極大をもつ色素に変化し、光を受容すると G_i 共役型の G タンパク質を活性化する状態になる。興味深いことに、このオプシンは、網膜では視細胞のみに発現することがわかった。O_{pn5n} が G_i 共役型の受容体であることを考慮すると、cAMP の濃度変化が重要と報告されている視細胞の明暗での形態変化 (網膜運動現象) やメラトニン産生・分泌などに関与している可能性がある。遺伝子改変メダカを作製して検討したところ、このオプシンが視細胞の形態変化に関与していることが明らかになった。

オプシン類が可視光を受容するために必要な対イオン (グルタミン酸残基) の位置の解析から、O_{pn5} グループは先祖型の紫外光感受性から対イオンの変位がおこり、可視光感受性の O_{pn5n} が特異的に多様化したと考えられた。そこで、変異体解析により O_{pn5n} における対イオンを検討した結果、これまでのオプシンで発見されている位置とは異なる位置に対イオンが存在することがわかった。また、O_{pn5n} の分子特性を検討した結果、先祖型の O_{pn5} が持つと考えられた不活性状態 (11シスレチナル結合型) と活性状態 (全トランスレチナル結合型) との光相互変換が見られなかった。さらに、多くの O_{pn5} が11シスレチナルだけでなく、全トランス型とも直接結合するのに対し、O_{pn5n} は11シス型とのみ直接結合した。この性質は視覚オプシンと同じ性質であり、視細胞内で機能するためには、暗ノイズの原因となる全トランス型との直接結合を減じるように特殊化したことが考えられた。

4) 新口動物 O_{pn5} の分子特性の探索

O_{pn5} 遺伝子は脊椎動物に広く見いだされ、4つのサブグループに分類できる。これらのうち、O_{pn5m} および O_{pn5L2} サブグループは紫外光感受性のオプシンである一方、O_{pn5n} サブグループは可視光感受性のオプシンである。また、O_{pn5L1} サブグループは全トランスレチナルとのみ結合する特異なオプシンである。そこで、脊椎動物の O_{pn5} の多様化がどのように起こったのかの手がかりを得

るために、脊椎動物以外の新口動物の O_{pn5} の分子特性やその発現部位を解析した。まず、種々の新口動物のゲノムで O_{pn5} の遺伝子を探索したところ、ナメクジウオやムラサキウニから O_{pn5} 遺伝子を見いだすことができた。また、これらは分子系統樹上で脊椎動物の4つのサブグループとは独立したサブグループを形成することが考えられた。そこで、これらの分子特性を解析するために実験条件を最適した結果、リコンビナント体を作製することに成功した。その結果、これら2つともに11シスレチナルと結合し紫外光受容体を形成することがわかった。また、紫外光を受容後に G_i 活性化する活性状態になり、さらに元の状態と活性状態の間は光で相互に変換することが確認できた。このような分子特性は脊椎動物の O_{pn5m} および O_{pn5L2} サブグループと共通していた。以上のことから、脊椎動物で多様化している O_{pn5} の先祖型は紫外光感受性のオプシンであったことが推定された。さらに、パフンウニを実験材料にして O_{pn5} の発現部位を解析した結果、初期発生の胚と成体で局所的に発現シグナルを確認することができた。

5) 他のオプシン類の解析:

O_{pn5} グループと脊椎動物視覚オプシングループの多様化プロセスでは、ともに可視光受容に重要なアミノ酸残基 (対イオン) の変異が起こる。そこで、脊椎動物視覚オプシンでの多様化プロセスを明らかにするために、多様化プロセスの中間に位置すると考えられるホヤオプシンの解析を行った。その結果、ホヤオプシンは2つのグルタミン酸が対イオンとして機能するユニークなスペクトル制御システムを有することがわかった。一つのグルタミン酸は無脊椎動物の視覚オプシンが対イオンとして利用する Glu181 であり、もう一つは脊椎動物の視覚オプシンが対イオンとして利用する Glu113 であった。また、その分子特性は無脊椎動物型の視覚オプシンと脊椎動物型の視覚オプシンの中間的な性質を示すことがわかった。

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15件)

Sato K, Yamashita T, Haruki Y, Ohuchi H, Kinoshita M, Shichida Y. Two UV-Sensitive Photoreceptor Proteins, O_{pn5m} and O_{pn5m2} in Ray-Finned Fish with Distinct Molecular Properties and Broad Distribution in the Retina and Brain. *PLoS One*. 2016 11(5):e0155339. doi: 10.1371/journal.pone.0155339.
Sakai K, Yamashita T, Imamoto Y, Shichida Y. Diversity of Active

States in TMT Opsins. PLoS One. 2015 10(10):e0141238. doi: 10.1371/journal.pone.0141238.

Koyanagi M, Wada S, Kawano-Yamashita E, Hara Y, Kuraku S, Kosaka S, Kawakami K, Tamotsu S, Tsukamoto H, Shichida Y, Terakita A. Diversification of non-visual photopigment parainopsin in spectral sensitivity for diverse pineal functions. BMC Biol. 2015 13:73. doi: 10.1186/s12915-015-0174-9.

Imamoto Y, Kojima K, Oka T, Maeda R, Shichida Y. Helical rearrangement of photoactivated rhodopsin in monomeric and dimeric forms probed by high-angle X-ray scattering. Photochem Photobiol Sci. 2015 Nov;14(11):1965-73. doi: 10.1039/c5pp00175g.

Yanagawa M, Kojima K, Yamashita T, Imamoto Y, Matsuyama T, Nakanishi K, Yamano Y, Wada A, Sako Y, Shichida Y. Origin of the low thermal isomerization rate of rhodopsin chromophore. Sci Rep. 2015 5:11081. doi: 10.1038/srep11081.

Sato K, Yamashita T, Shichida Y. Contribution of glutamic acid in the conserved E/DRY triad to the functional properties of rhodopsin. Biochemistry. 2014 Jul 15;53(27):4420-5. doi:10.1021/bi5003772.

Yamazaki Y, Nagata T, Terakita A, Kandori H, Shichida Y, Imamoto Y. Intramolecular interactions that induce helical rearrangement upon rhodopsin activation: light-induced structural changes in metarhodopsin IIa probed by cysteine S-H stretching vibrations. J Biol Chem. 2014 May 16;289(20):13792-800. doi: 10.1074/jbc.M113.527606.

Sasaki K, Yamashita T, Yoshida K, Inoue K, Shichida Y, Kandori H. Chimeric proton-pumping rhodopsins containing the cytoplasmic loop of bovine rhodopsin. PLoS One. 2014 Mar 12;9(3):e91323. doi: 10.1371/journal.pone.0091323.

Maeda R, Hiroshima M, Yamashita T, Wada A, Nishimura S, Sako Y, Shichida Y, Imamoto Y. Single-molecule observation of the ligand-induced population shift of rhodopsin, a G-protein-coupled receptor. Biophys J. 2014 106(4):915-24. doi: 10.1016/j.bpj.2014.01.020.

Yamashita T, Ono K, Ohuchi H, Yumoto A, Gotoh H, Tomonari S, Sakai K, Fujita H, Imamoto Y, Noji S, Nakamura K, Shichida Y. Evolution of mammalian Opn5 as a specialized UV-absorbing pigment by a single amino acid mutation. J Biol Chem. 2014 Feb 14;289(7):3991-4000. doi: 10.1074/jbc.M113.514075.

Kojima K, Imamoto Y, Maeda R, Yamashita T, Shichida Y. Rod visual pigment optimizes active state to achieve efficient G protein activation as compared with cone visual pigments. J Biol Chem. 2014 Feb 21;289(8):5061-73. doi: 10.1074/jbc.M113.508507.

Tsutsui K, Tachibanaki S, Shimauchi-Matsukawa Y, Shichida Y, Kawamura S. Different phosphorylation rates among vertebrate cone visual pigments with different spectral sensitivities. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Nov 1;440(4):630-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.118.

Imamoto Y, Shichida Y. Cone visual pigments. Biochim Biophys Acta. 2014 May;1837(5):664-73. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.08.009.

Imamoto Y, Seki I, Yamashita T, Shichida Y. Efficiencies of activation of transducin by cone and rod visual pigments. Biochemistry. 2013 52(17):3010-8. doi: 10.1021/bi3015967.

Yanagawa M, Yamashita T, Shichida Y. Glutamate acts as a partial inverse agonist to metabotropic glutamate receptor with a single amino acid mutation in the transmembrane domain. J Biol Chem. 2013 Apr 5;288(14):9593-601. doi: 10.1074/jbc.M112.437780.

[学会発表](計52件)

T. Yamashita "Molecular properties of vertebrate UV-sensitive opsin Opn5" Gordon Research Conference, Galveston/USA (2016.26.Jan.)

山下高廣・小野勝彦・大内淑代・湯本茜・後藤仁志・友成さゆり・酒井佳寿美・藤田洋史・今元泰・野地澄晴・中村克樹・七田芳則「哺乳類光受容体 Opn5m の分子特性と発現部位の解析」日本動物学会第86回大会 新潟 (2015.17.Sept.)

春木慶洸・佐藤恵太・山下高廣・大内淑代・後藤仁志・小野勝彦・友成さゆり・酒井佳寿美・安齊賢・木下政人・七田芳則「光受容体 Opn5L1 を発現する細胞の

性質」日本動物学会第 86 回大会 新潟 (2015.17.Sept.)
佐藤恵太・山下高廣・春木慶洸・木下政人・大内淑代・七田芳則「魚類における光受容タンパク質 Opn5m の組織局在」日本動物学会第 86 回大会 新潟 (2015.17.Sept.)
佐藤恵太・山下高廣・大内淑代・友成さゆり・酒井佳寿美・今元泰・和田昭盛、七田芳則「Opn5L1 は光サイクル性の反応で制御される G タンパク質共役型受容体である」第 53 回日本生物物理学会年会 金沢 (2015.13.Sept.)
T. Yamashita “Molecular properties of brain photoreceptor protein Opn5” “RNA and Clock 2015” symposium 淡路夢舞台国際会議場 兵庫 (2015.25.Mar.)
T. Yamashita “Molecular properties of vertebrate non-visual opsins, Opn5” 16th International Conference on Retinal Proteins 長浜 (2014.8.Oct.)
K. Sato, T. Yamashita, H. Ohuchi, S. Tomonari, A. Takeuchi, S. Fujita-Yanagibayashi, K. Sakai, Y. Imamoto, S. Noji, A. Wada and Y. Shichida “Molecular properties of Opn5L1, a photoreceptor protein found in non-mammalian vertebrates.” 16th International Conference on Retinal Proteins 長浜 (2014.6.Oct.)
T. Yamashita “Diversity of molecular properties of vertebrate non-visual opsin Opn5” 第 52 回日本生物物理学会年会 札幌 (2014.26.Sept.)
山下高廣「脊椎動物新規紫外光受容タンパク質 Opn5 の解析」第 18 回日本光生物学協会年会 大阪 (2014.23.Aug.)
山下高廣「視覚以外の機能に関わるロドプシン類の分子特性」第 11 回 GPCR 研究会 東京 (2014.10.May)
T. Yamashita “Diversity of molecular properties of vertebrate non-visual opsin group, Opn5” 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology Sydney/Australia (2013.11.Nov.)
K. Kojima, T. Yamashita, Y. Imamoto, M. Tsuda, Y. Kasakabe and Y. Shichida 「ホヤオプシン 1(Ci-opsin1)の分子特性の解析」第 51 回日本生物物理学会年会 京都 (2013.30.Oct.)
K. Sato, T. Yamashita, H. Ohuchi, S. Tomonari, S. Fujita-Yanagibayashi, K. Sakai, A. Takeuchi, Y. Imamoto, S. Noji, A. Wada and Y. Shichida 「光依存的な G タンパク質活性化能を失ったロドプシン類の発見とその不活性化機構の解析」第 51 回日本生物物理学会年会 京都 (2013.30.Oct.)

佐藤恵太・山下高廣・大内淑代・後藤仁志・小野勝彦・安齋賢・木下政人・友成さゆり・湯本茜・柳林彩理・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 の組織局在」日本動物学会第 84 回大会 岡山 (2013,26,Oct.)
沢田幾太郎・山下高廣・大内淑代・七田芳則「新口動物がもつ光受容タンパク質 Opn5 の分子特性の比較解析」日本動物学会第 84 回大会 岡山 (2013,26,Oct.)
山下高廣・大内淑代・湯本茜・佐藤恵太・友成さゆり・木下政人・野地澄晴・七田芳則「可視光感受性タンパク質 Opn5 の分子特性解析」日本動物学会第 84 回大会 岡山 (2013,26,Oct.)
Y. Shichida “Molecular Evolution and Functional Diversity of Opsins” 15th Congress of the European Society for Photobiology Liege (Belgium) (2013.3 Sept.)

〔図書〕(計 3 件)

七田芳則他 朝倉書店 光と生命の辞典 2016 422.
Sato Y. and Shichida Y. “Evolution and Diversity of Visual pigments in Connection with Their Functional Difference” in “Vertebrate Photoreceptors” Springer 2014 349.
Yamashita T. and Shichida Y. “Molecular aspect of evolution and diversity of animal photoreception” in “Evolution and Senses” Springer. 2013 46.

〔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

七田 芳則 (SHICHIDA, Yoshinori)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：6 0 1 2 7 0 9 0

(2) 研究分担者

今元 泰 (IMAMOTO, Yasushi)
京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：8 0 2 6 3 2 0 0

(3) 研究分担者

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：5 0 3 7 8 5 3 5