

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440167

研究課題名(和文) 無脊椎動物の光受容タンパク質オプシン5における機能発現メカニズム

研究課題名(英文) Analysis of the photoreceptive protein Opn5 found in invertebrates

研究代表者

山下 高廣 (YAMASHITA, TAKAHIRO)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50378535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Opn5は新口動物に広く見いだされる光受容タンパク質オプシンである。脊椎動物では4つのグループに分類でき、分子特性や生体内での発現部位が多様化していることを見いだしている。本研究では、脊椎動物以外の新口動物のOpn5について解析を行った。ウニとナメクジウオのOpn5のリコンビナント体を作製したところ、両者とも紫外光感受性であった。またウニにおいて発現部位を探索したところ、成体の感覚器官であると言われる管足と初期発生のある段階に発現することを見いだした。このことから、ウニは幅広い発生段階で紫外光を利用している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Opn5 constitutes one of the photoreceptive protein, opsin, groups, whose gene is widely distributed in deuterostome genomes. We previously revealed that vertebrate Opn5 is classified into several subgroups and is diversified based on their molecular properties and tissue distribution patterns. In this study, we analyzed Opn5 found from deuterostomes other than vertebrates. We successfully obtained the recombinant proteins of these Opn5 proteins after reconstituted with 11-cis-retinal. The molecular properties of these Opn5 proteins shared with those of several vertebrate Opn5 subgroups. In addition, we detected Opn5 expression signals both during early development and in adult of sea urchin. These data suggest that sea urchin utilizes Opn5 in a variety of developmental stages to respond to light environment.

研究分野：分子生理学

キーワード：光受容 オプシン シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

動物はものの形や色を認識するだけでなく、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。その中でもオプシン5 (Opn5) はヒト・マウスのゲノムから単離され、網膜や脳における発現が報告されたものの、その詳細な局在や分子特性に関する情報はなく機能未知であった。また、他の脊椎動物のゲノム上で Opn5 グループの遺伝子を探索すると、ほとんどの哺乳類は 1 遺伝子 (Opn5m) しか持たないが、哺乳類以外の脊椎動物は複数の Opn5 遺伝子を持ち、これら脊椎動物の Opn5 遺伝子は 4 つのサブグループ (Opn5m, L1, L2, n) に分類できることがわかる。これまで、これらの分子特性や生体内での発現部位を比較解析することを進めてきた。分子特性を解析した結果、Opn5m と Opn5L2 は 11 シス型レチナルを結合し、紫外光感受性の光受容タンパク質を形成することがわかった。つまり、ヒトを含む哺乳類も広く紫外光感受性のオプシンを持つと言える。一方、Opn5L1 と Opn5n は結合するレチナル異性体や吸収する光波長が Opn5m/L2 とは異なり、脊椎動物の Opn5 では分子特性が大きく多様化していることがわかった。また、4 つのサブグループをすべて 1 遺伝子ずつもつニワトリにおいて生体内での発現部位を比較しても、網膜や脳内においてそれぞれ特徴的な発現パターンを示すことがわかった。

このように Opn5 グループは脊椎動物で大きく多様化しているが、このグループに含まれると思われる遺伝子は、ウニやナメクジウオといった脊椎動物以外の新口動物のゲノムにも見いだすことができる。そして、これらは脊椎動物の Opn5 のどれかのサブグループと分子系統樹上で明瞭にクラスターを形成する訳ではなく、遺伝子配列以上に解析が全く進んでいない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、脊椎動物以外の新口動物のゲノムに見いだされる Opn5 をターゲットとして、その分子特性や生体内局在部位を明らかにすることを目的とする。そして、これまでに進めてきた脊椎動物の Opn5 の解析を並行して進めることにより、その結果とあわせて Opn5 グループの分子特性や生体内局在、さらには生理機能について、共通性と多様性を明らかにすることを目指す。

## 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) 新口動物 Opn5 の解析

脊椎動物以外の新口動物のゲノムでは、頭索動物や棘皮動物、半索動物に Opn5 遺伝子を見いだすことができた。これらのうち、全長 cDNA を推測できたナメクジウオとウニの Opn5 について培養細胞でリコンビナント体を作製することに成功した。その結果、両者とも 11 シス型レチナルを結合し紫外光感受性を示した。そして、光受容後に G タンパク質を活性化した。これは、脊椎動物の 4 つのサブタイプのうち 2 つ (Opn5m/L2) と同じであった、この結果を Opn5 の分子系統樹と併せて考察すると、新口動物の Opn5 の祖先型は紫外光感受性であり、脊椎動物が持つ分子特性が異なるサブタイプ (Opn5L1、Opn5n) はそこから多様化したと考えられた。

また、バフンウニを用いて生体内における Opn5 の発現部位を探索した。mRNA の発現を RT-PCR で確認したところ、成体の感覚器官と言われる管足に発現が見られた。また、初期発生のある段階において発現することもわかった。そして、in situ hybridization を行ったところ、成体の管足と初期発生のある段階で、mRNA が限局して発現する部分があることが確認できた。このことから、バフンウニは幅広い発生段階で紫外光を利用している可能性が示唆された。

### (2) 脊椎動物 Opn5m2 の解析

Opn5m は両生類から哺乳類までの動物に広く 1 遺伝子ずつ見いだすことができる。一方、多くの魚類のゲノムには、Opn5m 遺伝子だけでなく、そのパラログである Opn5m2 遺伝子を見いだすことができる。この Opn5m2 遺伝子の解析を行った。リコンビナント体を作製したところ、11 シス型レチナルを結合し紫外光感受性を示し、Opn5m と共通であった。一方、Opn5m2 は全トランス型レチナルを直接結合できず、Opn5m と異なる性質であった。また、in situ hybridization により発現部位を解析したところ、魚類では Opn5m と Opn5m2 遺伝子が網膜と脳内の様々な細胞に発現していることがわかった。このことから、魚類では多くの領域で紫外光を感受する能力を有していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件、すべて査読有り)

1. K. Sakai, T. Yamashita, Y. Imamoto and Y. Shichida (2015) Diversity of active states in TMT opsins. *PLoS One* e0141238, DOI: 10.1371/journal.pone.0141238.
2. M. Yanagawa, K. Kojima, T. Yamashita,

- Y. Imamoto, T. Matsuyama, K. Nakanishi, Y. Yamano, A. Wada, Y. Sako and Y. Shichida (2015) Origin of the low thermal isomerization rate of rhodopsin chromophore. *Sci. Rep.* 5, 11081, DOI: 10.1038/srep11081
3. K. Sato, T. Yamashita and Y. Shichida (2014) Contribution of glutamic acid in the conserved E/DRY triad to the functional properties of rhodopsin. *Biochemistry* 53, 4420-5, DOI: 10.1021/bi5003772.
4. K. Sasaki, T. Yamashita, K. Yoshida, K. Inoue, Y. Shichida and H. Kandori (2014) Chimeric proton-pumping rhodopsins containing the cytoplasmic loop of bovine rhodopsin. *PLoS One* 9, e91323, DOI: 10.1371/journal.pone.0091323.
5. R. Maeda, M. Hiroshima, T. Yamashita, A. Wada, S. Nishimura, Y. Sako, Y. Shichida and Y. Imamoto (2014) Single-molecule observation of the ligand-induced population shift of rhodopsin, a G-protein-coupled receptor. *Biophys J.* 106, 915-24, DOI: 10.1016/j.bpj.2014.01.020.
6. T. Yamashita, K. Ono, H. Ohuchi, A. Yumoto, H. Gotoh, S. Tomonari, K. Sakai, H. Fujita, Y. Imamoto, S. Noji, K. Nakamura and Y. Shichida (2014) Evolution of mammalian Opn5 as a specialized UV-absorbing pigment by a single amino acid mutation. *J. Biol. Chem.* 289, 3991-4000, DOI: 10.1074/jbc.M113.514075.
7. K. Kojima, Y. Imamoto, R. Maeda, T. Yamashita and Y. Shichida (2014) Rod visual pigment optimizes active state to achieve efficient G protein activation as compared with cone visual pigments. *J Biol Chem.* 289, 5061-73, DOI: 10.1074/jbc.M113.508507.
8. Y. Imamoto, I. Seki, T. Yamashita and Y. Shichida (2013) Efficiencies of activation of transducin by cone and rod visual pigments. *Biochemistry* 52, 3010-8, DOI: 10.1021/bi3015967.

〔学会発表〕

招待講演等（計 8 件）

1. T. Yamashita 「Molecular properties of vertebrate UV-sensitive opsin Opn5」 Gordon Research Conference (2016,26th,Jan., Galveston/USA)
2. T. Yamashita 「Molecular properties of brain photoreceptor protein Opn5」 “RNA and Clock 2015” symposium (2015,25th,Mar., 淡路夢舞台国際会議場/兵庫県)
3. T. Yamashita 「Molecular properties of

vertebrate non-visual opsins, Opn5」 16th International Conference on Retinal Proteins (2014,8th,Oct., 長浜市/滋賀県)

4. 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シンポジウム (2014,26th, Sep., 札幌コンベンションセンター/北海道)
5. 山下高慶 「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 奨励賞招待講演 (2014,23rd, Aug., 大阪市立大学/大阪府)
6. 山下高慶 「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 (2014,10th, May, 日本科学未来館/東京都)
7. 山下高慶 「脊椎動物非視覚オプシン Opn5 グループの多様な分子特性」 分子研研究会 (2013,19th, Nov., 岡崎コンファレンスセンター/愛知県)
8. T. Yamashita 「Diversity of molecular properties of vertebrate non-visual opsin group, Opn5」 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology (2013,11th, Nov., Sydney/Australia)

その他学会発表（計 3 8 件）

1. 山下高慶・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「哺乳類光受容タンパク質 Opn5 の分子特性と発現部位の解析」日本動物学会第 86 回大会 (2015,17th, Sep., 新潟コンベンションセンター/新潟県)
2. 春木慶洸・佐藤恵太・山下高慶・大内淑代・後藤仁志・小野勝彦・友成さゆり・酒井佳寿美・安齋賢・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 (2015,17th, Sep., 新潟コンベンションセンター/新潟県)
3. 小島慧一・山下高慶・今元泰・日下部岳広・津田基之・七田芳則「ホヤオプシン 1 (Ci-opsin1) の分子特性の解析」日本動物学会第 86 回大会 (2015,19th, Sep., 新潟コンベンションセンター/新潟県)
4. 佐藤恵太・山下高慶・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 (2015,19th, Sep., 新潟コンベンションセンター/新潟県)
5. 松谷優樹・小島慧一・柳川正隆・山下高慶・今元泰・山野由美子・和田昭盛・七田芳則「両生類の緑桿体に含まれる青色錐体視物質の熱活性化頻度」(2015,19th, Sep., 新潟コンベンションセンター/新潟県)
6. K. Kojima, M. Yanagawa, T. Yamashita, Y. Matsutani, Y. Imamoto, T. Matsuyama, K. Nakanishi, Y. Yamano, A. Wada, Y. Sako and Y. Shichida “Molecular

- mechanism of the low thermal activation rate of visual pigments” 第 53 回日本生物物理学学会年会 (2015,13th,Sep., 金沢大学/石川県)
7. K. Sakai, T. Yamashita, Y. Imamoto and Y. Shichida “ Comparative studies on the molecular properties between TMT1 and TMT2 opsins ” 第 53 回日本生物物理学学会年会 (2015,13th,Sep., 金沢大学/石川県)
  8. K. Yoshida, K. Inoue, T. Yamashita, R. Abe-Yoshizumi, M. Tanaka, K. Sasaki, Y. Shichida and H. Kandori “ Construction of chimeric proteins for optical control of Gs-protein activity ” 第 53 回日本生物物理学学会年会 (2015,13th,Sep., 金沢大学/石川県)
  9. M. Yanagawa, M. Hiroshima, T. Yamashita, Y. Shichida and Y. Sako “ Single-molecule imaging of GPCR oligomerization followed by internalization ” 第 53 回日本生物物理学学会年会 (2015,13th,Sep., 金沢大学/石川県)
  10. K. Sato, T. Yamashita, H. Ohuchi, A. Takeuchi, S. Tomonari, K. Sakai, Y. Imamoto, A. Wada and Y. Shichida. “ Opn5L1 is a photocyclic GPCR ” 第 53 回日本生物物理学学会年会 (2015,14th,Sep., 金沢大学/石川県)
  11. T. Yamashita, K. Ono, H. Ohuchi, A. Yumoto, H. Gotoh, S. Tomonari, K. Sakai, H. Fujita, Y. Imamoto, S. Noji, K. Nakamura and Y. Shichida “ Evolution of mammalian Opn5 as a specialized UV-absorbing pigment by a single amino acid mutation ” FASEB summer meeting (2015,15th,June, Big Sky/USA)
  12. K. Sato, T. Yamashita, H. Ohuchi, A. Takeuchi, S. Tomonari, K. Sakai, Y. Imamoto, A. Wada and Y. Shichida “ Non-mammalian photoreceptor protein Opn5L1 is a photocyclic G protein-coupled receptor ” FASEB summer meeting (2015,15th,June, Big Sky/USA)
  13. K. Kojima, M. Yanagawa, T. Yamashita, Y. Imamoto, T. Matsuyama, K. Nakanishi, Y. Yamano, A. Wada, Y. Sako and Y. Shichida “ Origin of the low thermal isomerization rate of rhodopsin chromophore ” FASEB summer meeting (2015,15th,June, Big Sky/USA)
  14. K. Kojima, Y. Imamoto, R. Maeda, T. Yamashita and Y. Shichida “ Rod visual pigment optimizes active state to achieve efficient G protein activation as compared to cone visual pigments. ” 16th International Conference on Retinal Proteins (2014,6th,Oct., 長浜市/滋賀県)
  15. K. Sakai, T. Yamashita, Y. Imamoto and Y. Shichida “ Comparative study of properties of TMT/Opn3 group opsins. ” 16th International Conference on Retinal Proteins (2014,6th,Oct., 長浜市/滋賀県)
  16. K. Sakurai, A. Onishi, H. Imai, O. Chisaka, T. Yamashita, K. Nakatani and Y. Shichida “ Physiological analyses of mouse rods expressing chicken green cone opsin. ” 16th International Conference on Retinal Proteins (2014,6th,Oct., 長浜市/滋賀県)
  17. 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 (2014,6th,Oct., 長浜市/滋賀県)
  18. A. Wada, T. Okitsu, N. Futamura, Y. Niimi, T. Ishizuka, H. Yawo, T. Matsuyama Hojos, T. Yamashita and Y. Shichida “ Preparation of Red-Shifted PSB of Retinal Having Enamine Structure. ” 16th International Conference on Retinal Proteins (2014,6th,Oct., 長浜市/滋賀県)
  19. M. Yanagawa, M. Hiroshima, T. Yamashita, Y. Shichida and Y. Sako “ Direct observation of higher-order oligomerization of GPCR followed by internalization. ” 16th International Conference on Retinal Proteins (2014,6th,Oct., 長浜市/滋賀県)
  20. K. Yoshida, K. Inoue, T. Yamashita, R. Abe-Yoshizumi, K. Sasaki, Y. Shichida and H. Kandori “ Optical control of Gs-protein signaling by microbial rhodopsin chimeras. ” 16th International Conference on Retinal Proteins (2014,6th,Oct., 長浜市/滋賀県)
  21. M. Yanagawa, M. Hiroshima, T. Yamashita, Y. Shichida and Y. Sako 「1 分子イメージングによる代謝型グルタミン酸受容体の高次多量体形成と内在化の解析」第 52 回日本生物物理学学会年会 (2014,26th,Sep., 札幌コンベンションセンター/北海道)
  22. K. Kojima, M. Yanagawa, T. Yamashita, Y. Imamoto, T. Matsuyama Hoyos, Y. Yamano, A. Wada, Y. Sako and Y. Shichida 「ロドプシンの低い熱活性化頻度の分子メカニズム」第 52 回日本生物物理学学会年会 (2014,26th,Sep., 札幌コンベンションセンター/北海道)
  23. R. Maeda, M. Hiroshima, Y. Imamoto, T. Yamashita, Y. Sako and Y. Shichida 「ロドプシン構成的活性変異体 M257Y にお

- る構造平衡の一分子観測」第 52 回日本生物物理学会年会 (2014,26th,Sep., 札幌コンベンションセンター/北海道)
24. K. Yoshida, K. Inoue, T. Yamashita, R. Abe-Yoshizumi, K. Sasaki, Y. Shichida and H. Kandori「新規キメラタンパク質による Gs タンパク質の光制御」第 52 回日本生物物理学会年会 (2014,26th,Sep., 札幌コンベンションセンター/北海道)
25. 佐藤恵太・山下高廣・大内淑代・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「非哺乳脊椎動物が持つ光受容タンパク質 Opn5L1 の光不活性化」日本動物学会第 85 回大会(2014,11th,Sep., 東北大学/宮城県)
26. 柳川正隆・小島慧一・山下高廣・今元泰・松山オジヨス武・中西香爾・山野由美子・和田昭盛・佐甲靖志・七田芳則「ロドプシン発色団の低い熱異性化速度の生化学的測定」日本動物学会第 85 回大会 (2014,11th,Sep., 東北大学/宮城県)
27. M. Yanagawa, M. Hiroshima, T. Yamashita, Y. Shichida and Y. Sako「1 分子イメージングによる代謝型グルタミン酸受容体の細胞内動態解析」第 51 回日本生物物理学会年会 (2013,28th,Oct., 国立京都国際会館/京都府)
28. K. Yoshida, K. Inoue, T. Yamashita, R. Abe-Yoshizumi, K. Sasaki, Y. Shichida and H. Kandori「Gs および Gq の光制御に向けた新規キメラタンパク質のデザイン」第 51 回日本生物物理学会年会 (2013,28th,Oct., 国立京都国際会館/京都府)
29. R. Maeda, M. Hiroshima, Y. Imamoto, T. Yamashita, Y. Sako and Y. Shichida「G タンパク質共役型受容体の構成的活性変異体に見られる G タンパク質活性化メカニズムの一分子解析」第 51 回日本生物物理学会年会 (2013,28th,Oct., 国立京都国際会館/京都府)
30. 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 (2013,28th,Oct., 国立京都国際会館/京都府)
31. 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 (2013,28th,Oct., 国立京都国際会館/京都府)
32. T. Yamashita, H. Ohuchi, A. Yumoto, K. Sato, S. Tomonari, M. Kinoshita, S. Noji and Y. Shichida「脊椎動物の可視光感受性 Opsin5 の分子特性解析」第 51 回日本生物物理学会年会 (2013,28th,Oct., 国立京都国際会館/京都府)
33. T. Matsuyama Hoyosu, T. Yamashita, Y. Imamoto and Y. Shichida「マウスメラノプシンの分子特性」第 51 回日本生物物理学会年会 (2013,28th,Oct., 国立京都国際会館/京都府)
34. 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 (2013,26th,Sep., 岡山大学/岡山県)
35. 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(2013,26th,Sep., 岡山大学/岡山県)
36. 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(2013,26th,Sep., 岡山大学/岡山県)
37. 松山オジヨス武・山下高廣・今元泰・七田芳則「哺乳類の光量感知に関わるメラノプシンの G タンパク質活性化能」日本動物学会第 84 回大会(2013,26th,Sep., 岡山大学/岡山県)
38. 櫻井啓輔・大西暁士・今井啓雄・千坂修・山下高廣・中谷敬・七田芳則「ニワトリ緑色感受性錐体視物質を桿体視物質に発現させたノックインマウスの単一視細胞応答」日本動物学会第 84 回大会 (2013,26th,Sep., 岡山大学/岡山県)
- 〔図書〕(計 1 件)
1. 山下高廣、七田芳則 (2015)「代謝型グルタミン酸受容体の分子構造と機能」Clinical Neuroscience (中外医学社) 33, 25-7.
- 〔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](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・大学院理科学研究科・助教  
研究者番号：50378535
- (2)研究分担者  
なし
- (3)連携研究者  
なし