

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650113

研究課題名(和文)脊椎動物の視細胞に極めて高い光感受性をもたらした構造・機能分子への新規アプローチ

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlying high photosensitivity of vertebrate photoreceptor cells

研究代表者

深田 吉孝 (FUKADA, Yoshitaka)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80165258

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)：ヒトを含む脊椎動物は桿体・錐体という2種類の視細胞を備え、幅広い光強度の背景における視覚を獲得している。桿体・錐体の光応答特性の大きな差異を生み出す分子基盤に迫るため、両者の大きな違いである「視細胞の機能と形態」に着目し、ゼブラフィッシュを用いてその生理的役割を解明することを目指した。遺伝子改変技術を用いて機能欠損個体を作製し、転写因子Nr2e3が幅広い脊椎動物種において桿体の成熟に必要なことを見出した。さらに、この桿体が消失する個体を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、桿体特異的に発現する遺伝子を絞り込み、視細胞のユニークな形態形成機構に寄与する候補遺伝子の機能解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：The photoreceptor cells are classified into rod and cone cells, which are distinct from each other in photoresponses. Mechanisms underlying these properties are understood at the molecular level, and phototransduction proteins differentially expressed in the rods and cones contribute to the distinct photoresponses of these photoreceptors. However, the phototransduction mechanism reported to date does not fully explain the different photoresponses between the rods and cones. To reveal comprehensive understanding of the physiological properties of the photoreceptors, we focused on the characteristic feature of the morphology of the photoreceptor outer segment. By a genome editing technology, we generated rod-less zebrafish and performed RNA-seq analysis to isolate genes enriched in the rods. We are now investigating the candidate genes by generating knock-out zebrafish to understand the molecular mechanisms for the unique functions of the photoreceptors.

研究分野：生物学

キーワード：視覚 光受容 視細胞 転写制御 桿体 錐体 ゼブラフィッシュ CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む脊椎動物は、幅広い光強度の背景における光シグナリングを実行するために薄暗い環境で働く桿体と明所において機能する錐体という二種類の視細胞を獲得した。この二種類の視細胞の光応答特性は互いに大きく異なり、桿体は感度がより高く、錐体は光応答速度がより速いという特徴をもつ。このような桿体と錐体の機能の違いを生み出す分子基盤は視覚研究における大きな課題の一つである。従来の研究では、桿体と錐体の光シグナリング蛋白質の違いこそがその特徴的な機能を生み出す要因と考えられてきた。しかし最近、光シグナリング蛋白質(群)の違いだけでは桿体と錐体の大きな光応答特性の差異を説明できないことが分かってきた。そこで我々は、桿体と錐体の大きな違いでありながら、ほとんど手が付けられていない「視細胞の形態の違い」にスポットライトをあて、その生理的役割を解明することを目指した。

2. 研究の目的

(1) 視細胞形態の差異を生み出す分子機構の解明

視細胞の形態の違いは視覚の研究分野では古くから注目された事象であるが、この差異を生み出す分子機構については手がかりもない。この原因として、そもそも視細胞形態の形成機構についての知見が不十分であることと、*in vivo* 解析に良く用いられるマウス網膜は桿体が主であるために錐体に関する研究が進んでいないことが挙げられる。一方で、トカゲ類ではその活動時間帯の変化に合わせて(つまり動物の習性の変化に応じて)視細胞の形態がダイナミックに変化していることから、形態は少数の因子によって容易に(相対的に短時間のうちに)変化するのではないかと想像された。そこで我々は、モデル生物の中でも錐体と桿体の両方が発達しているゼブラフィッシュを用い、効率的に候補遺伝子を絞り込む戦略を採用した。ゼブラフィッシュの網膜においては桿体と錐体の細胞数がほぼ同じ程度であり、両細胞の比較解析に適している。また、硬骨魚類の松果体細胞には桿体光受容分子と近縁な光受容分子が発現しており[Mano *et al.* (1999) *Brain Res.*]、その遺伝子発現の調節機構は桿体と非常に似ていると想像される。一方、松果体細胞の形態は錐体に類似しており、やや変性したひだ状の外節をもつことから、負の比較対照として最適

であると考えられた。我々はこれまでに、セルソータを用いて桿体・錐体・松果体細胞をそれぞれ分取し、各細胞プールのマイクロアレイ解析を行ない約100個の桿体特異的遺伝子を同定した。本研究では、これらの遺伝子の機能解析から視細胞形態の差異を生み出す分子機構の解明という課題に挑戦し、解析の進んでいる光シグナリング蛋白質群の比較解析の結果を考慮に入れ、視細胞の形態形成と光応答特性の分子的リンクを明らかにする。

(2) 脊椎動物に共通した遺伝子発現制御メカニズムの解明

錐体には互いに異なる波長感受性を示すサブタイプが複数存在し、これらの組み合わせによって色覚が生じる。錐体サブタイプには、それぞれ別種類の光感受性タンパク質(オプシン)が発現している。主にマウスを用いた解析から、これらオプシンの発現や視細胞分化を制御する複数の転写因子による転写ネットワークが提唱されている[Swaroop *et al.* (2010) *Nat. Rev. Neurosci.*]。しかし、夜行性であるマウスの網膜は桿体が主であるため、錐体に関する研究が比較的進んでいない。特に多くの昼行性の脊椎動物が所持している中波長領域(緑色感受性と青色感受性)の錐体オプシン遺伝子の発現制御機構の解析は遅れ、謎に包まれていた。そこで、先述のマイクロアレイデータにおける錐体特異的な転写因子に着目し、脊椎動物に共通した遺伝子発現制御メカニズム解明を目指した。

3. 研究の方法

マイクロアレイ解析により同定した桿体あるいは錐体特異的な発現遺伝子の中から外節形態の形成に寄与する可能性のある遺伝子を挙げ、遺伝子改変技術であるTALENやCRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子欠損ゼブラフィッシュ変異体の作製により候補遺伝子の機能を評価した。また、同様の方法により桿体や錐体に特異的に発現する転写因子の欠損個体を作成し、光シグナリング関連分子の遺伝子発現への影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 桿体特異的な転写因子 Nr2e3 の機能解析

桿体の分化・成熟機構については哺乳類(主にマウス)において解析が進んでいるが、夜行性マウスにおいて提唱された機構が脊椎動物において広く保存されているか否か

は不明である。そこで本研究ではマウスにおいて桿体の成熟に関わることが知られている転写因子 Nr2e3 に着目し、TALEN を用いて変異ゼブラフィッシュ系統を作製した。その結果、Nr2e3 変異体では桿体が成熟せずに細胞死を起こすことを見出した（未発表）。ゼブラフィッシュ Nr2e3 の機能解析から、Nr2e3 は幅広い脊椎動物種において桿体の成熟に必要であり、脊椎動物種における桿体に特徴的な細胞形態が生じる分子メカニズムの共通性が強く示唆された。

我々が作製した Nr2e3 変異体は桿体の外節形成機構の解析に供する遺伝子の絞り込みに有用であると考えられた。そこで、桿体を欠損した Nr2e3 変異体を用いて遺伝子の網羅的な発現量解析技術である RNA-seq 解析を行うことにより、野生型と比較して Nr2e3 変異体の眼球において有意に発現低下する遺伝子、つまり桿体特異的に発現する遺伝子を絞り込んだ。さらにマイクロアレイ解析によって同定された桿体に高発現する遺伝子との共通部分を抽出し、約 60 個の桿体特異的遺伝子を得た。これらの中で桿体においてまだ機能が解析されていない遺伝子について視細胞変性マウスの網膜を用いた遺伝子発現解析を行い、視細胞変性マウスにおいて顕著に発現が低下する遺伝子、つまりマウス網膜においても視細胞に特に強く発現する遺伝子を同定した。さらに遺伝子発現量の日内変動にも着目した。Nr2e3 も含め、視細胞の分化・成熟に必須な転写因子や光シグナリング分子の遺伝子発現量は日内変動する。桿体特異的に発現する候補遺伝子の日内変動を調べたところ、細胞小器官の輸送関連因子の一部に明瞭な日内変動が存在することが分かり、視細胞の機能に対する重要性が示唆された。また、CRISPR/Cas9 システムを用いてこの候補遺伝子への変異導入に成功した。今後、この遺伝子の機能欠損個体の解析を進めることにより、視細胞のユニークな形態形成機構に迫ることができると考えている。

(2) 錐体特異的な転写因子 Six7 の機能解析

マイクロアレイ解析で独自に同定した 7 つの錐体特異的転写因子に対して、機能を欠損したゼブラフィッシュ系統を TALEN を用いて作製した。これらの変異体における光受容分子の発現解析を行った結果、six ファミリーに属する転写因子 Six7 の変異体において緑色感受性オプシンの発現がほぼ消失する

ことを見出し、錐体オプシンの遺伝子発現ネットワークの一部を解き明かすことができた [Ogawa, Shiraki *et al.* (2015) *Proc. Royal Soc. B*].

刻々と変化する複雑な光環境に適応するための一つの手段として、色弁別する能力の向上が挙げられる。ヒトや旧世界ザルに属する一部の霊長類においては、遺伝子重複とアミノ酸配列の変化により、波長スペクトルが互いに異なる 2 種類の赤色感受性の錐体オプシンが生じた。これら倍加して機能分化した錐体オプシンが別々の錐体細胞に発現することで、先祖では 2 色だった色弁別を 3 色へと向上させている。一方、真骨魚類に属するゼブラフィッシュにおいても、ヒトと同様の現象が生じたと考えられる [Takechi *et al.*, (2005) *J. Exp. Biol.*]. このため、脊椎動物の進化の過程において色弁別能を向上させるためには、倍加したオプシンの相互排他的な発現制御メカニズムを獲得することが重要であると考えられるが、その制御メカニズムは未知である。我々の研究により緑オプシンの発現制御に必須であることが明らかとなった転写因子 Six7 について、さらに解析を深めた。その結果、成魚 Six7 変異体においては、網膜に発現する 2 種類の赤オプシン遺伝子のうち一方 (*lws1*) の発現が上昇し、もう一方 (*lws2*) の発現が消失することを見出した。この結果から、Six7 は倍加した赤オプシン遺伝子の発現制御にも重要な因子であり、赤色感受性錐体と緑色感受性錐体の発現制御において Six7 は異なる機能を担っていると考えられた。今後、Six7 の相互作用因子を探索し、さらに Six7 が結合する DNA 配列を見出すことにより、倍加した錐体オプシン遺伝子の発現制御ネットワークにより深く迫ることができると考えている。

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 1 件)

1. Yohey Ogawa, Tomoya Shiraki, Daisuke Kojima and Yoshitaka Fukuda. Homeobox transcription factor Six7 governs expression of green opsin genes in zebrafish. *Proc. Royal Soc. B*, 282, 20150659 (2015)
<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.0659> 査読あり

〔学会発表〕(計 20 件)

1. Yohey Ogawa, Tomoya Shiraki, Daisuke Kojima, Yoshitaka Fukada : Transcriptional network for regulation of cone visual opsin genes in zebrafish. 第40回日本比較生理内分泌学会大会、日本比較生理生化学会第37回大会 合同大会、JMS アステールプラザ (広島県広島市) 2015年12月12日
2. Tomoya Shiraki, Yohey Ogawa, Daisuke Kojima, Yoshitaka Fukada : Identification and characterization of differentially expressed genes among ciliary type photoreceptor neurons in zebrafish. The 7th Asia and Oceania Conference on Photobiology, Taipei, (Taiwan) 2015 Nov.17 2015
3. Daisuke Kojima, Ikuko Sumikawa, Sho Matsumoto, Tomoya Shiraki, Yoshitaka Fukada : Multiple types of retinal photoreceptors mediate background adaptation in larval zebrafish. The 7th Asia and Oceania Conference on Photobiology, Taipei (Taiwan) Nov.16 2015
4. 白木 知也、小島 大輔、深田 吉孝:ゼブラフィッシュにおける光受容関連遺伝子の発現を調節する転写制御因子の機能解析. 日本動物学会第86回新潟大会、朱鷺メッセ (新潟県新潟市) 2015年9月19日
5. 小島 大輔、住川 育子、松本 翔、白木 知也、深田 吉孝:ゼブラフィッシュ幼生の体色変化を引き起こす網膜光受容体. 日本動物学会第86回新潟大会、朱鷺メッセ (新潟県新潟市) 2015年9月19日
6. Daisuke Kojima:Retinal photoreceptors for body color change in zebrafish. The 9th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry:From Molecules to Macrophysiology, Kraków (Poland) Aug.25 2015
7. 深田 吉孝、小川 洋平、白木 知也、小島 大輔 :ゼブラフィッシュ緑色感受性視物質の遺伝子発現を支配するホメオボックス転写因子 six7. 視覚科学フォーラム第19回研究会、ホテル福島グリーンパレス (福島県、福島市) 2015年8月19日
8. Yohey Ogawa, Tomoya Shiraki, Daisuke Kojima, Yoshitaka Fukada: A transcription factor governing expression of cone opsin genes in zebrafish retina. FASEB: Biology and Chemistry of Vision, Big Sky Resort, (USA) Jun.17-18 2015
9. Daisuke Kojima, Ikuko Sumikawa, Sho Matsumoto, Tomoya Shiraki, Yoshitaka Fukada: Photoreceptors mediating background adaptation in zebrafish. FASEB: Biology and Chemistry of Vision, Big Sky Resort, (USA) Jun.15-16 2015
10. 小川 洋平、白木 知也、小島 大輔、深田 吉孝 :ゼブラフィッシュ錐体オプシン遺伝子の発現制御. 日本動物学会第67回関東支部大会、早稲田大学・先端生命医科学センター (東京都新宿区) 2015年3月14日
11. 小川 洋平、白木 知也、小島 大輔、深田 吉孝 :Six3サブファミリーによるゼブラフィッシュ錐体オプシン遺伝子の発現制御. 日本動物学会第85回仙台大会 2014、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市) 2014年9月11日
12. 白木 知也、小島 大輔、深田 吉孝 :ゼブラフィッシュにおける光受容細胞の機能的差異をもたらす転写ネットワークの解析. 日本動物学会第85回仙台大会 2014、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市) 2014年9月11日
13. 白木 知也、小島 大輔、深田 吉孝 :ゼブラフィッシュ桿体の分化・成熟過程を制御する転写調節機構. 視覚科学フォーラム第18回研究会、前橋工科大学 (群馬県前橋市) 2014年8月18日
14. Tomoya Shiraki, Daisuke Kojima, Yohey Ogawa, Yoshitaka Fukada: Transcriptional Profiles of Ciliary Photoreceptor Neurons in Zebrafish. 11th International Conference on Zebrafish Development and Genetics. Madison (USA) Jun.27 2014
15. 小島 大輔 :動物の背地適応を制御する光受容分子の探索. 自然科学研究機構分子科学研究所分子研研究会「ロドプシン研究の故きを温ねて新しきを知る」、自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市) 2013年11月18日
16. 小川 洋平、小島 大輔、深田 吉孝 :ゼブラフィッシュにおける錐体視細胞の分化機構へのアプローチ. 日本動物学会第84回岡山大会、岡山大学津山キャンパス (岡山県岡山市) 2013年9月26日
17. 白木 知也、小川 洋平、小島 大輔、深田 吉孝 :ゼブラフィッシュにおける視細胞分化機構の解析. 視覚科学フォーラム第17回研究会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市) 2013年8月5日
18. Tomoya Shiraki, Yohey Ogawa, Daisuke Kojima, Yoshitaka Fukada: Gene expression profiles of ciliary photoreceptor neurons reveal a transcriptional network for photoreceptor differentiation in

- zebrafish. 2013 日本比較生理生化学会第 35 回大会、イーグレひめじ(兵庫県姫路市) 2013 年 7 月 13 日
19. 小川 洋平、白木 知也、小島 大輔、深田 吉孝: 視細胞における錐体特異的な転写因子の機能解析. 第 36 回日本神経科学大会第 56 回日本神経化学会大会第 23 回日本神経回路学会大会合同大会、国立京都国際会館(京都府京都市) 2013 年 6 月 22 日
 20. Tomoya Shiraki, Daisuke Kojima, Yohey Ogawa, Yoshitaka Fukada: Comparative gene expression profiling among ciliary photoreceptor neurons in zebrafish. FASEB: Biology and Chemistry of Vision, Steamboat Springs(USA) Jun. 12 2013

〔図書〕(計 1 件)

1. 深田 吉孝, 朝倉書店、光と生命の事典、2016、pp.212-213

〔産業財産権〕

なし

〔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

深田 吉孝 (FUKADA, Yoshitaka)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号: 80165258

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

白木 知也 (SHIRAKI, Tomoya)
東京大学・大学院理学系研究科・特任助教
研究者番号: 40632352