

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891022

研究課題名(和文)メラノプシンが非視覚応答を担う分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of melanopsin to induce non-image forming responses

研究代表者

羽鳥 恵 (Hatori, Megumi)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：90590472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の目の数%の網膜神経節細胞には青色光感受性の光受容タンパク質メラノプシンが発現しており、概日時計の位相調節や瞳孔の開閉などの非視覚応答を制御する。メラノプシンは桿体・錐体の光受容体とは異なり、無脊椎動物オプシンに類似していると考えられている。網膜の視覚応答・非視覚応答を理解するために、本研究ではランダムミュータジェネシスおよび特定の領域を狙うメラノプシン変異体作製を同時並行させた。哺乳類培養細胞にメラノプシン変異体を発現させ、青色光照射によるカルシウム濃度の変化、つまりメラノプシン光応答をin vitroで測定し、数種類の光応答変異体を単離した。

研究成果の概要(英文)：Melanopsin photopigment expressed in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells plays a crucial role in the adaptation of mammals to ambient light environment through both image-forming and non-image-forming visual responses. The melanopsin-expressing retinal ganglion cells are structurally and functionally distinct from classical rod/cone photoreceptors and have unique properties, including single-photon response, long response latency, photon integration over time, and slow deactivation. To understand the molecular property of melanopsin, I generated various mutant versions of melanopsin, and these proteins were expressed in mammalian cells. Blue light-dependent increases in cytosolic calcium were monitored. By using this assay system, several of mutant melanopsin were obtained to show in vitro response difference compared to wild type melanopsin, and the effect of these mutant melanopsin on non-image forming responses will be evaluated in vivo in mice.

研究分野：神経科学

キーワード：メラノプシン 概日リズム 網膜

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類では全身のほぼすべての細胞に、一日を周期とする体内の時計である概日時計が備わっている。中でも行動を支配する概日時計は視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN) に存在し、中枢時計と呼ばれる。SCN の時計は外界の光周期に同調する。

哺乳類の光受容感覚器は目の網膜である。網膜には桿体・錐体に加え、第三の光受容細胞がごく一部 (約 1 - 2%) の網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell; RGC) に存在する [文献 1]。この細胞は光受容タンパク質であるメラノプシン (melanopsin) を発現しているため、他の RGC と区別してメラノプシン発現網膜神経節細胞 (melanopsin-expressing retinal ganglion cell; mRGC) と呼ばれる (図 1)。mRGC は視覚以外の光応答を担っており、概日時計の位相調節、瞳孔収縮、光回避反応などの非視覚応答に寄与する。mRGC は自身で光を感じると共に (故に mRGCs は intrinsically photosensitive retinal ganglion cells; ipRGCs と呼ばれる) 桿体・錐体からの情報入力も受ける。mRGC は桿体・錐体からの光情報を集約してから非視覚応答を引き起こしており、つまり非視覚応答の情報ハブとして必要不可欠である [文献 2]。

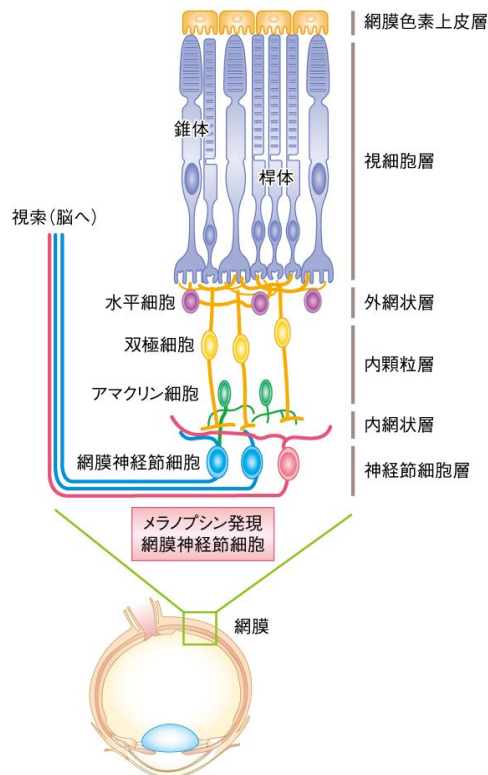


図 1 哺乳類の網膜と光受容細胞  
哺乳類の網膜には桿体、錐体、メラノプシン発現網膜神経節細胞という 3 種類の光受容

細胞が発現している。桿体および錐体はおもに視覚応答を、メラノプシン発現網膜神経節細胞はおもに非視覚応答を担う。

### < 引用文献 >

Megumi Hatori and Satchidananda Panda. The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends Mol Med.* 2010, 16(10):435-46. DOI: 10.1016/j.molmed.2010.07.005.

Megumi Hatori, Hiep Le, Christopher Vollmers, Sheena Racheal Keding, Nobushige Tanaka, Christian Schmedt, Timothy Jegla, Satchidananda Panda. Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses. *PLoS One.* 2008, 3(6):e2451. DOI: 10.1371/journal.pone.0002451.

## 2. 研究の目的

メラノプシンは桿体・錐体の光受容体とは異なり、無脊椎動物の光受容体に類似した情報伝達系を持つと示唆されているが、その詳細やメラノプシン分子のどの部位がいかなる機能を担っているか等の詳細には未だ謎が多く残っている。網膜および視覚応答・非視覚応答を理解するために、メラノプシンがいかに制御されているのかを解明する。

## 3. 研究の方法

メラノプシンの性質を明らかにするためランダムミュータジェネシスおよび特定の領域を狙う変異体作製を同時並行させ変異体を作製する。哺乳類培養細胞を暗黒条件下で維持し、メラノプシン変異体を細胞に発現させ、青色光を照射によるカルシウム濃度の変化、つまりメラノプシンの光応答を *in vitro* で測定する。光応答変異体を単離することが出来た場合には、得られた変異体を組換えアデノ随伴ウイルスベクターを用いてマウスの網膜神経節細胞に発現させて非視覚応答を測定し、変異部位の意義を *in vivo* で評価する。

## 4. 研究成果

メラノプシンは青色光に吸収極大をもち、光の照射によりイノシトールトリスリン酸経路が活性化され細胞内のカルシウム濃度が上昇することが知られている。つまり言い換えると、メラノプシンの光応答活性は、細

胞内のカルシウム濃度の上昇によって評価できる。CHO 細胞などの哺乳類培養細胞はメラノプシンを有していない。そこで、メラノプシンを CHO 細胞に外部から導入して発現させ、その細胞を恒暗条件下で培養し、アッセイ時に青色光を照射したのち細胞内のカルシウム濃度を測定してメラノプシンの活性化レベルの変化を評価する系 [ 文献 ] を、所属大学にて立ち上げた。実際に、マウスの野生型およびヒトの野生型のメラノプシンを CHO 細胞に強制発現させて光応答を確認することが出来た。

上記メラノプシン活性化 *in vitro* 評価系の立ち上げと併行し、マウスのメラノプシンの変異体作製に取り掛かった。これまでに数十種類の変異体の作製が終了した。中でも一部の変異体は光応答の速度や程度などに野生型との違いが見られ、現在より詳細な解析を順次進めている。

*in vivo* での非視覚応答の評価系の立ち上げ、上記変異体をマウス個体に導入し、変異が与える影響を解析する。

#### < 引用文献 >

Kenneth A. Jones, Megumi Hatori, Ludovic S. Mure, Jayne R. Bramley, Roman Artymyshyn, Sang-Phyo Hong, Mohammad Marzabadi, Huailing Zhong, Jeffrey Sprouse, Quansheng Zhu, Andrew T. E. Hartwick, Patricia J. Sollars, Gary E. Pickard, Satchidananda Panda. Small-molecule antagonists of melanopsin-mediated phototransduction. *Nature Chemical Biology*, 9, 2013, 630-635 DOI: 10.1038/nchembio.1333.

#### 5 . 主な発表論文等

##### [ 雑誌論文 ] ( 計 8 件 )

津山淳、羽鳥恵、時計システムと老化、日本臨牀、査読無、2016 In press

羽鳥恵、ブルーライト研究の歴史と概日時計との関わり、ブルーライトテキストブック、査読無、2016 In press

羽鳥恵、網膜 視床下部の光応答、光と生命の事典、査読無、2016、214-215

DOI: 無

URL:

<https://www.asakura.co.jp/books/isbn/978-4-254-17161-7/>

Megumi Hatori and Satchidananda Panda. Response of peripheral rhythms to the timing of food intake. *Methods Enzymol.*

査読有 552、2015、145-161

DOI: 10.1016/bs.mie.2014.10.027.

羽鳥恵、体内時計への入力、Medical Science Digest、査読無、41、2015、382-385 DOI: 無

URL:

<http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/msd.html>

羽鳥恵、坪田一男、体内時計と眼、アンチ・エイジング医学、査読無、11、2015、385-392 DOI: 無

URL:

<http://www.m-review.co.jp/magazine/id/46>

羽鳥恵、概日リズムと老化、第三版アンチエイジング医学の基礎と臨床、査読無、2015、65-66 DOI: 無

URL:

<http://www.medicalview.co.jp/catalog/ISBN4-7583-0491-2.html>

羽鳥恵、眼と時間生物学、眼科研修ノート 改訂第 2 版、査読無、2015、445-447 DOI: 無

URL:

<http://www.shindan.co.jp/books/index.php?menu=10&cd=217400&kbn=1>

##### [ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

羽鳥恵、概日リズムと老化、日本抗加齢医学会 ( 招待講演 )、2016 年 3 月 27 日、大手町サンケイプラザ ( 東京都千代田区 )

羽鳥恵、概日時計と外界環境との調和機構、第 8 回 Symphony ( 招待講演 )、2015 年 9 月 27 日、ホテルメトロポリタンエドモント ( 東京都千代田区 )

羽鳥恵、体内時計の理解と生活習慣病やブルーライト弊害の予防、第 8 回日本薬学会関東支部若手シンポジウム ( 招待講演 )、2015 年 9 月 12 日、日本大学薬学部キャンパス ( 千葉県船橋市 )

羽鳥恵、時間生物学の基礎 - メラノプシンと概日リズム、Cataract Academic Seminar ( 招待講演 )、2015 年 8 月 2 日、JP タワーホール & カンファレンス ( 東京都千代田区 )

##### [ 図書 ] ( 計 0 件 )

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

無

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

羽鳥 恵 (HATORI, Megumi)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：90590472

### (2)研究分担者

無

### (3)連携研究者

無