

# Photoreceptome 解析による動物の光受容システムの起源及び多様性の解明

●小柳 光正<sup>1)</sup> ◆寺北 明久<sup>1)</sup> ◆徳永 史生<sup>2)</sup> ◆久富 修<sup>2)</sup>

1) 大阪市立大学大学院理学研究科 2) 大阪大学大学院理学研究科

## <研究の目的と進め方>

本研究では、ほとんど全ての動物が持つ「光受容システム（視覚や概日リズムの光調節など）」に注目し、このシステムが動物進化の過程でどのように進化、多様化したのかを分子レベルで理解することを目指す。私たちが注目する光受容タンパク質・オプシンは、光受容システムの入り口に位置し、その物性は受容する波長（色）や駆動するシグナル伝達系、さらには細胞応答までも規定し、光受容システムの性質の大部分を決定する。したがってオプシンの基本的性質を解析することは、光受容システムの生理的役割や進化的意義の理解へとつながると考えられる。そこで私たちは、以下の2つの研究の方向性に沿って、オプシンの生化学的・分光学的実験による物性解析を進める。(I) これまでの光受容システムの研究はモデル生物など特定の生物に限定して行われてきたので、新たに進化的にキーとなる生物の光受容システムを解析することによって、動物の光受容システムの起源や脊椎動物・節足動物の視覚、色覚進化の解明を目指す。(II) 多くの動物は複数のオプシンを持つが、ゲノム解読によって初めて見出された機能未知のオプシンが多数存在する。これらの機能解析を通して動物の未知の光作用性生理機能（光感覚）の発見を目指す。さらに多様なオプシンの比較機能解析を行うことによって、光受容タンパク質をモデルとして遺伝子の多様化と生理機能の多様化との関連の解明を試みる。また、新たに見出した光受容システムについては、システムに関わる分子群を同定し、光受容システムの全容解明および既知のシステムとの比較解析を目指して、光受容器官のEST解析を随時行っていく。

## <2007年度の研究の当初計画>

(I) 動物の光受容システムの多様性を系統的に理解する目的で、三胚葉動物の出現以前に分岐した原始的な多細胞動物（海綿動物や腔腸動物）の光受容システムの解析を行ってきた。これまでに中枢神経系を持たないが高度に発達したレンズ眼を持つアンドククラゲからオプシンを同定した。2007年度は、アンドククラゲオプシンの分子特性を解明し、三胚葉動物の持つオプシン類との比較解析を通してオプシンおよび光受容システムの多様性に迫る。具体的には、まずアンドククラゲオプシンの生化学的・分光学的解析のための動物培養細胞での大量発現系を構築する。また、分子系統解析から、アンドククラゲのオプシンは新規の光シグナル伝達系を駆動していることが示唆されたので、免疫組織学的解析と生化学的解析を行い、共役するGタンパク質やその下流分子を同定する。さらに、アンドククラゲのレンズ眼のEST解析を行い、単純な動物の光受容システム中の機能タンパク質、構造タンパク質を調べ、三胚葉動物の光受容システムと比較解析を行う。

(II) ゲノム解読によって見出された機能未知オプシンの物性解析を行い、動物の新しい光作用性生理機能やその分子基盤の解明を目指す。特に、オプシンの多様度が高い硬骨魚類に注目し、培養細胞発現系による光受容タンパク質の物性解析を行う。特に、私たちは、これまでの解析から視覚系以外での波長識別すなわち“色”の重要性を示唆する結果を得ているので、その点に注目し

て研究を展開する。また、光受容システムの細胞レベルの出力である神経投射を明らかにするために、ゼブラフィッシュへのGFPの導入を行う。この解析によって、各オプシンが関わる生理機能を理解する手がかりが得られると同時に、複数のオプシンの細胞レベルでの相互作用が明らかにできると期待している。加えて、ヒトにおいて脳や肝臓など非光受容器官での発現が報告されているが、生理機能との関連が不明のオプシン類（*opn3*, *opn5*）について、実際に光受容体として機能するかどうかという基本的な点から調べる。

## <2007年度の成果>

・腔腸動物アンドククラゲのオプシンの単離、培養細胞でのタンパク質発現、分光解析に成功し、二胚葉動物においてもオプシンが光受容システムを担っていることを明らかにした。さらに、二胚葉動物と三胚葉動物の間で光受容システム全体を比較する目的で、500個のアンドククラゲレンズ眼を採取し、支援班の協力のもとEST解析に着手した。

・近年、哺乳類以外の脊椎動物が、概日リズムの光センサー・メラノプシンを複数持つことが明らかとなり注目されている。私たちはトラフグやニトリの複数のメラノプシンの物性解析に成功し、メラノプシンには吸収する色に多様性があることを見出した（Torii et al., 2007）。このことは、概日リズムの光調節に色情報が使われている可能性を示唆している。また、私たちは、メラノプシンと系統的に近い、無脊椎動物の視覚のオプシン類の培養細胞の発現、物性解析にも初めて成功し、メラノプシンとの詳細な物性解析を通して、オーソログ遺伝子による生理機能の多様性と分子機能の多様性に関する知見を得た（Terakita et al., 2007）。

・分子系統解析によって、私たちが松果体のUV光感受性オプシンとして同定したパラピノプシンには二種類のタイプが存在することを見出し、もう一方のパラピノプシンが緑感受性オプシンであることを突き止めた。さらにUV光感受性型、緑色感受性型パラピノプシンは共に松果体の先端部に近接した異なる細胞で発現していることが明らかとなった。この部位は、松果体の色識別を行っている部位であることから、パラピノプシンが松果体色識別を担っていることが示唆された。また、松果体のUV受容の神経レベルの解析を行い特徴的な性質を見出した（Kawano-Yamashita et al., 2007）。

・脊椎動物、昆虫類とは異なる、新規色覚メカニズムの解明を目指してハエトリグモからオプシンを単離し、節足動物門における色覚の進化（Koyanagi et al., 2008）および網膜内分布を明らかにした。ハエトリグモのレンズは色収差（波長によって焦点距離が変わること）を生じることが知られており、また、網膜は外節が4層に積み重なった特殊な構造をしているが、解析の結果、ハエトリグモのオプシンは色収差を解消するような順（焦点距離の短い短波長の光の受容体ほどレンズに近く）に配置していることがわかった。今後、電気生理学実験を行い、光学系と色覚との直接的な関連を明らかにしていく。

・ヒトの脳や肝臓などに存在するオプシン様遺伝子（*opn3*）につ

いて、その他生物ホモログの培養細胞での発現に成功し、確かに光受容体として機能することを示した。このことは、ヒトの脳や他の臓器が光受容能を持つ可能性を提示している。

#### <国内外での成果の位置づけ>

これまで三胚葉性動物以前に出現した動物、海綿動物や腔腸動物の光受容システムの研究はほとんど行われておらず、私たちが確立したアンドククラゲオプシンの培養細胞発現系は、原始的動物の視物質解析を初めて可能とするものである。アンドククラゲオプシンの性質の解明が進めば、三胚葉動物における多様な光受容システムを系統的に理解することが可能となり、加えて、中枢神経系を持たない動物がどのようにして形態視を行っているのかについても手がかりが得られると期待している。また、私たちが行ったハエトリグモの視物質の解析の結果からは、ハエトリグモの色覚メカニズムは、レンズ特性などの光学系を利用した全く新しいシステムの可能性が示唆され、動物の光情報の抽出法についての新しい概念を提示するものと考えられる。

近年、私たちが、松果体でUV光という特殊な波長域の光を受容するパラピノプシンを発見したことにより、非視覚系における色の役割への関心が高まっている。私たちは、松果体のパラピノプシン、概日リズムの光センサー・メラノプシンについて“色”の多様性をタンパク質の物性レベルで明らかにしており、これらの成果は“非視覚系色覚”の分子基盤さらには生理機能の解明に向けて、国内外から注目されている。

本研究で私たちのグループが構築したオプシンの培養細胞での大量発現系は、これまで困難であった多様なオプシン類の基本性質（吸収波長域、光反応特性、シグナル伝達カスケードなど）の直接解析を可能とするものである。この培養細胞発現系は国際的にも注目されており、私たちのグループ以外には構築が困難であることから、国内外からの共同研究の依頼も多い。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

アンドククラゲレンズ眼のEST解析のための試料調整は、採取シーズンが限られていること、今シーズンは不漁であったことから困難を極め、最終的に予定より数ヶ月遅れての開始となった。ゼブラフィッシュを用いた多様なオプシン類の網羅的神経ネットワークおよび生理機能解析のための各種コンストラクト作製が、技術的な問題から予定通りには進まなかった。研究に用いたオプシンの中で、1/4程度については、培養細胞での発現に成功しなかったが、これは、本来困難とされている実験であるので、予想の範囲内である。

#### <今後の課題>

本研究ではオプシン類の培養細胞での発現と発現タンパク質の物性解析が基盤であるので、発現に成功していないオプシンについては、実験条件の調整や他生物のホモログ遺伝子を用いることで、着実に研究を進めていく。特にヒトの脳や肝臓で発現が認められる *opn3* については、すでに成功している他生物ホモログの発現条件を参考に早急に進め、ヒトの脳や肝臓での光感受性に関する直接証拠を得たい。アンドククラゲの光受容システムおよびレンズ眼の組成・構造を明らかにするために計画したEST解析を完了させ、先行研究である高等動物レンズ眼ESTプロファイルとの比較解析を行う必要がある。機能未知オプシンの生理機能の解明のための各種トランスジェニックゼブラフィッシュの作製と行動解析のアクセシ系の確立が必要である。

#### <成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 0801291237

Koyanagi, M., Nagata, T., Katoh, K., Yamashita, S., Tokunaga, F. Molecular Evolution of Arthropod Color Vision Deduced

from Multiple Opsin Genes of Jumping Spiders. *J Mol. Evol.* In press (2008).

2. 0801291249

Terakita, A., Tsukamoto, H., Koyanagi, M., Sugahara, M., Yamashita, T., Shichida, Y. Expression and comparative characterization of Gq-coupled invertebrate visual pigments and melanopsin. *J Neurochem.* In press (2007).

3. 0801291302

Kawano-Yamashita, E., Terakita, A., Koyanagi, M., Shichida, Y., Oishi, T., Tamotsu, S. Immunohistochemical characterization of a parainopsin-containing photoreceptor cell involved in the ultraviolet/green discrimination in the pineal organ of the river lamprey *Lethenteron japonicum*. *J Exp. Biol.* 210(Pt 21), 3821-3829 (2007).

4. 0801291305

Torii, M., Kojima, D., Okano, T., Nakamura, A., Terakita, A., Shichida, Y., Wada, A., Fukada, Y. Two isoforms of chicken melanopsins show blue light sensitivity. *FEBS Lett.* 8581(27), 5327-5331 (2007).

5. 0701151601

Yamamoto, S., Hisatomi, O., Hasegawa, A., Kobayashi, Y., and Tokunaga, F. Distribution and Translocation of Photoreceptor Gbetagamma-phosducin System in Medaka Retina. *Photochem. Photobiol.* 83(1), 35-39 (2007).

6. 0801291314

Hasegawa, A., Hisatomi, O., Yamamoto, S., Ono, E., Tokunaga, F. Stathmin expression during newt retina regeneration. *Exp. Eye Res.* 85(4), 518-527 (2007).

7. 0801291316

Imanishi, Y., Hisatomi, O., Yamamoto, S., Satoh, T., Kotaka, S., Kobayashi, Y., Tokunaga, F. A third photoreceptor-specific GRK found in the retina of *Oryzias latipes* (Japanese killifish). *Zoolog. Sci.* 24(1), 87-93 (2007).

2) 著書

1. 0801291327

Comparison of genes expressed in normal and regenerating newt retinas. In “Strategies for Retinal Tissue Repair and Regeneration in Vertebrates: From Fish to Human” /Research Signpost India (ed. by Chikafumi Chiba) Hasegawa, A., Tatsushi, G., Hasegawa, K., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Kobayashi, H., Komaya, R., Tokunaga, F., and Hisatomi, O. (2007).

3) 班員との共同研究

- ・縦襟鞭毛虫の光受容タンパク質の探索・機能解析について、京都大学・岩部直之博士（比較ゲノム）のグループと共同研究を行っている。
- ・ナメクジウオのオプシンの機能解析および微小組織での発現解析について、東京大学・窪川かおる博士（比較ゲノム）のグループと共同研究を行っている。
- ・トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた機能未知オプシン類の神経ネットワークおよび生理機能解析について、国立遺伝学研究所・川上浩一博士（比較ゲノム）のグループと共同研究を行っている。
- ・アンドククラゲ感覚器複合体（レンズ眼）のEST解析について、完全長cDNAライブラリ作製およびシークエンス解析を比較ゲノム研究支援班の協力の下で行っている。