

眼外光受容における“色検出”に関わる光受容タンパク質の 機能解析

Functional characterization of extraocular “color-sensitive” pigments.

(日本動物学会推薦)

研究代表者 大阪市立大学 寺北明久 Osaka City University Akihisa Terakita

協同研究者 大阪市立大学 小柳光正 Osaka City University Mitsumasa Koyanagi

Pineal and its related organs are known to be photosensitive in lower vertebrates. In a variety of lower vertebrates, such as lamprey, trout, pike and frogs, the pineal complex detects the ratio of UV light to visible light in environmental light, which achieves the wavelength-discrimination in the pineal complex independently of eyes. We previously identified that the parapinopsin, one of the non-visual pigments of vertebrates, functions as a UV-sensitive pigment in the wavelength-discrimination of the lamprey pineal. We here isolated the parapinopsin homologues from the pufferfish and zebrafish pineals in addition to the rainbow trout and the clawed frog pineal complexes where the UV-sensitivity and the wavelength-discrimination have been electrophysiologically demonstrated. The molecular phylogenetic analyses including these parapinopsin homologues indicated that they actually clustered with the lamprey parapinopsin, forming the parapinopsin group. To elucidate the

functional diversity in the parapinopsin group, the parapinopsins were expressed in cultured cells and spectroscopically investigated. The spectroscopic properties of these parapinopsins together with their localization profile in the pineals suggested that they are involved in the wavelength-discrimination of the pineal.

研究目的

多くの動物は、光情報を多様な視物質ロドプシンやその類似光受容タンパク質（ロドプシン類とよぶ）により受容し、視覚のみならず体内時計の調節などの視覚以外の機能にも利用している。例えば、ヒトは9種類のロドプシン類遺伝子を持ち、視覚や概日時計の光調節のための光受容に用いている。これまでに、われわれはなぜ多様なロドプシン類が存在するのかを知るために、ロドプシン類の主要なサブグループの分子特性を解明し、アミノ酸配列（構造）の多様性と機能の多様性との関係や、分子進化と機能多様性との関連を明らかにしてきた。その過程で、視覚以外での“色識別”という興味深い機能を担うロドプシン類を発見した。

魚類、両生類、爬虫類などの下等な脊椎動物では、松果体やそれと関連する眼外光受容器官は、UV光または青色光と可視光（緑色光）との比率を検出する“色識別”能を有することが古くより知られている。この視覚以外での“色識別”機構を明らかにするために、われわれはまず光受容タンパク質を同定することを試みた。その結果、発達した松果体を持つ円口類ヤツメウナギを用いて、松果体の色識別に関わるUV感受性光受容タンパク質として、パラピノプシンを同定した。さらにパラピノプシンについて、様々な動物のゲノムデータベースの検索やcDNAクローニングを行った結果、少なくとも魚類（ゼブラフィッシュ、トラフグ）は、UV感受性パラピノプシンに加えて、分子系統樹上で極めて近縁であるが明らかに区別されるもう一つのパラピノプシンを持つことを発見した。そこで本研究では、①2種類のパラピノプシンの吸収特性を分光学的手法により明らかにするとともに、②局在を免疫組織学的手法により解析し、2つパラピノプシンが松果体での色識別に関与しているのかを検討した。また、③2種類のパラピノプシンの機能多様性をもたらすアミノ酸残基を変異体解析により同定し、多様化のメカニズムについても考察した。

研究経過

① 2種類のパラピノプシンの培養細胞での発現と分光学的解析

パラピノプシンは、眼と比較して小さな松果体にわずかにしか存在しないので、松果体から単離して解析することは難しい。そこで、われわれは、HEK293培養細胞を用いてパラピノプシンを強制的に発現させ、得られたタンパク質に発色団レチナールを加えて色素を生成させることを試みた。その結果、フグとゼブラフィッシュがそれぞれ持つパラピノプシンの色素の生成に成功した。さらに、抗体の認識部位を導入するなど工夫することにより、それらの色素を精製し、精度よく分光学的に解析した。その結果、パラピノプシンの一方（PP1として分類）は、吸収極大をUV領域にもち、ヤツメウナギのパラピノプシンと同様であったが、もう一方（PP2として分類）は、興味深いことに、吸収極大が可視光領域に存在した。このパラピノプシンの吸収スペクトルの多様性は、眼外の光受容タンパク質の色に対する多様化の初めての例である。フグやゼブラフィッシュなどの魚類では、UV受容と可視光受容の2種類に多様化したパラピノプシンが松果体での“色”検出を担っている可能性が考えられた。

免疫組織化学的手法を用いたパラピノプシンの機能解析

これまでの研究から、松果体における色識別は、光受容細胞からの情報を統合する神経節細胞で行われていることが示唆されている（Fig. 1）。そこで、これら2種類のパラピノプシンが、異なる細胞に存在しているのかを免疫組織化学的に解析した。解析のために、トラフグパラピノプシンのPP1とPP2の部分ペプチドを大腸菌により大量発現させて抗原を作製し、マウスまたはウサギに免疫して抗体の作製を行った。それらの抗体を用いて、トラフグ松果体でのPP1とPP2の二重染色を行った。その結果、トラフグ松果体のごく限られた部分で、PP1とPP2は別々の細胞に存在していた。すなわち、松果体では、Fig1のUVと可視光受容細胞がそれぞれPP1とPP2によりUVと可視光を捉え、神経節細胞でその情報が統合され、可視光とUV光の比率が検出されていることが示唆された。

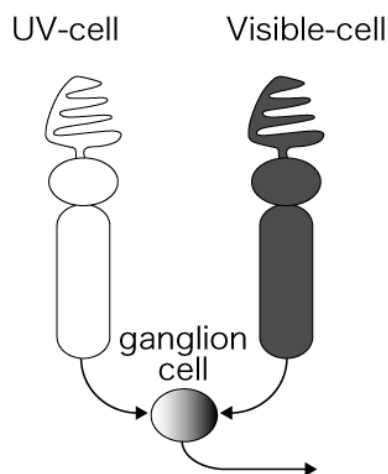


Fig 1 Connection between photoreceptor cells and a ganglion cell in the “color-sensitive” pineal. UV cell, UV light-sensitive photoreceptor cell; Visible cell, visible light-sensitive photoreceptor cell.

変異体解析によるパラピノプシンの多様化の解析

分子系統解析から、分子進化の過程でUV感受性のパラピノプシン (PP1) から可視光感受性のパラピノプシン (PP2) が多様化したと考えられる。視覚におけるUV光視物質と可視光視物質の多様化メカニズムと比較するために、PP1とPP2の吸収スペクトルを制御しているアミノ酸残基を解析した。PP1グループとPP2グループに含まれるパラピノプシンのアミノ酸配列を比較し、PP1とPP2のそれぞれのグループの中では高度に保存されているが、グループの間では異なるアミノ酸残基を選び出し、PP1にはPP2のアミノ酸残基を、PP2にはPP1に見られるアミノ酸残基を導入し、吸収スペクトルがUV感受性から可視光感受性に、または可視光感受性からUV感受性にそれぞれ変換されるのかを解析した。その結果、膜貫通ドメインに存在するただ1つのアミノ酸残基の置換が、UVと可視受容を決定していることが示唆された。この吸収スペクトルの制御機構は、既知の視物質の制御機構とは全く異なっており、視覚と松果体の色受容機構は独立に獲得されたことが示唆された。

考察

パラピノプシンは、最初ナマズの副松果体で発見された。その後、私たちは、最も下等な脊椎動物である円口類のヤツメウナギに同定し、それがUV色素であることを示した。本研究により、魚類にはパラピノプシンのホモログが2種類存在し、一方は既知のパラピノプシンと同様にUV色素であるのに対して、もう一方は可視光受容色素であることがわかった。そこで、円口類と魚類の他に、パラピノプシンが脊椎動物のどの範囲で存在しているのかを調べたところ、分子系統関係からUV受容型であると考えられるパラピノプシンをカエルの眼外に見いだした。パラピノプシンを持つこれらの動物は、いずれも眼外における“色識別”能が報告されており、パラピノプシンが下等脊椎動物に広く存在し眼外での“色受容”の光受容体として機能していると言える。この眼外での色識別がどのような生理機能と結びついているのかは完全には明らかにされていない。最近、保智己博士（奈良女子大学）は、ヤツメウナギの松果体でのUV光と可視光の比率の検出は遊泳行動の頻度と関係していることを報告しており、大変注目している。

本研究を進める過程で、メラノプシンという概日リズムの光調節に関与する色素においても、多様性があり、色に対して多様化している可能性を見いだした。視覚以外ではたらく2種類のロドプシン類において、受容する色が多様化しているという事実は、下等脊椎動物においての松果体での色識別が重要な生理機能と結びついていることを強く示唆している。

研究発表

口頭

1. A. Terakita: Expression and characterization of diverged bistable pigments in rhodopsin family. 12th International Conference on Retinal Proteins (Awaji, Japan) 2006 年 6 月
2. 寺北明久、小柳光正、七田芳則：脊椎動物の視覚以外の光受容に関わるパラピノプシンの機能多様性 日本比較生理生化学会第 28 回大会（浜松）2006 年 7 月
3. 小柳光正、寺北明久、七田芳則：松果体の光受容タンパク質パラピノプシンの分子進化 日本進化学会 2006 年大会（東京）2006 年 8 月
4. 寺北明久¹、小柳光正¹、七田芳則：松果体の光受容タンパク質パラピノプシンの多様性 第 14 回日本光生物学協会年会 奈良 2007 年 7 月
5. A. Terakita: Comparative characterization of bistable pigments in visual and non-visual photoreception. 7th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, (Salvador, Brazil) 2007 年 8 月
6. E.Kawano-Yamashita, A. Terakita, M. Koyanagi, T. Oishi, Y. Shichida, and S. Tamotsu.: Immunohistochemical characterization of parapinopsin-containing photoreceptor cell involved in the UV/green discrimination in the pineal organ of the lamprey
7. 小柳光正、七田芳則、寺北明久 眼外光受容タンパク質パラピノプシンの多様性の解析 日本動物学会第 78 回大会（弘前）2007 年 9 月
8. 寺北明久：円口類と硬骨魚類の松果体における“色”検出機構とオプシンの多様性 平成 19 年度 東京大学海洋研究所共同利用研究集会『魚類の適応と進化の統合生物学：遺伝子から行動まで』東京 2007 年 12 月

紙上

1. A. Terakita, H. Tsukamoto, M. Koyanagi, M. Sugawara, T. Yamashita and Y. Shichida: Expression and comparative characterization of Gq-coupled invertebrate visual pigments and melanopsin. *J. Neurochem.* in press (2008)
2. M. Koyanagi and A. Terakita: Gq-Coupled Rhodopsin Subfamily Composed of Invertebrate Visual Pigment and Melanopsin. *Photochem. Photobiol.* In press (2008)