

脊椎動物の網膜発生過程における体内時計の 光センサー・メラノプシンの役割の解明

徳島大学大学院 ソシオテクノサイエンス研究部
ライフシステム部門
大内 淑代

1. 研究の背景と目的

光は動物の様々な行動や生理に影響を与えており、睡眠はその典型であるが、それ以外に概日リズムの同調、体温、心臓の鼓動などにも影響している。このような光依存型の行動と生理には、第三の光センサーであるメラノプシン(Melanopsin, Opsin 4)という視物質が主に関与し、視覚を司る桿体と錐体の光センサーが主役ではないことが明らかにされている。メラノプシンは、網膜神経節細胞の1~2%に存在し、メラノプシン発現神経節細胞の軸索は概日リズムを制御する視床下部視交叉上核に投射し、視覚中枢中継核である外側膝状体や視蓋には投射しない。先に私は、このような非視覚性の光センサー細胞が網膜発生の比較的初期から形成されることを発見した。桿体、錐体視細胞の発生メカニズムについては、これまでに国内外で研究が進み、網膜視神経疾患の診断、変性網膜に対する細胞治療等その知見が生かされつつある。しかし、メラノプシン発現細胞など非視覚性光受容細胞の発生メカニズムについては全く解明が進んでおらず、その生理機能への影響を考えると早急に解明されることが望まれる。そこで、本研究では、メラノプシン発現細胞はどのようにして発生、分化するかについて注目し、まず抗体を作製して孵化前後のニワトリ網膜におけるメラノプシン陽性網膜細胞の同定を行った。さらに、別の非視覚性光センサーであるニューロプシン(Neuropsin, Opsin 5)についても、メラノプシンと比較して解析を行い、研究成果を得たので報告する。

2. 方法

本研究では、哺乳類に比べ多くの視物質をもち、多様な光受容能をもつと考えられる「鳥類」を実験モデル動物として用いた。また、光センサー細胞の「発生メカニズム」の解明を目指しているので、胚操作の最も確立しているニワトリ(胚) *Gallus gallus* を用いた。ニワトリは、二つのメラノプシン遺伝子をもつが、本研究では、アミノ酸レベルの相同性において哺乳類のメラノプシンに近縁であるmammalian type Opsin 4 (cOpn4m)に対して、ポリクローナル抗体を作製した。作製した抗体を用いて、17日胚および孵化後10日の網膜の免疫組織化学的解析を行った。次に、cOpn4m発現網膜細胞の性質を明らかにするために、三量体Gタンパク質 α サブユニット (Gna)に着目し、網膜におけるcOpn4mとGnaとの共存性について調べた。同様な実験をニューロプシンについても行い、メラノプシンの場合と結果を比較した。ニワトリは、少なくとも3つのニューロプシン遺伝子をもつが、本研究では、アミノ酸レベルの相同性において哺乳類のOpsin 5より近縁であるmammalian type Opsin 5 (cOpn5m)について調べた。

3. 結果

17日胚網膜においてcOpn4mタンパク質は、アマクリン細胞層の一部の細胞集団に存在し、ヒヨコ網膜においては双極細胞層の多くの細胞に存在していた。この結果は、これまでに報告された*cOpn4m* mRNAの局在部位と一致した。従って、メラノプシンは発生後期の網膜にタンパク質レベルで存在し、光を受容している可能性が示唆された。次に、GPCRとして機能しているかどうかの手がかりを得るために、Gnaとの共存性について調べた。Gnaにはいくつかのメンバーがあり、例えば Transducin/Gnat1, Gnat2 は桿体・錐体視細胞と共役している。一方、メラノプシンは分子系統樹上、無脊椎動物の感桿型視細胞ロドプシンと近縁であり、これらの網膜ロドプシンはq型Gna (Gnaq) と共役していることが明らかにされている。最初、これらGnaに対する市販抗体を用いて免疫二重染色を行ったが、ニワトリ網膜で明確な陽性シグナルを得ることができなかった。そこで、Gna遺伝子断片を単離し、免疫染色後 in situ hybridization法を行った。その結果、17日胚網膜においてメラノプシンcOpn4mは、*Gna11* mRNAや*GnaQ* mRNAを発現する細胞集団の一部に存在した。ニワトリGna11は分子系統樹上、GnaQと近縁であり、両者ともGnaqサブファミリーのメンバーである。従って、ニワトリのメラノプシンcOpn4mも、Gnaqと共役していることが示唆された。17日胚網膜ですでに*Gnaq* mRNAはcOpn4mと共存していることから、cOpn4mは発生後期網膜で光を受容しGタンパク質を活性化させ、膜電位を変化させている可能性がある。今後、Gnaに対してもニワトリ特異的抗体を作製して、タンパク質レベルでの解析を進める予定である。

ニューロプシン (Opsin 5) は、分子系統樹上、メラノプシンとも桿体・錐体オプシンとも全く異なる、機能未知なロドプシン類である。我々は、ニワトリ胚網膜より *Opsin 5* cDNAを単離して、mRNAレベルでの発現細胞について先に報告した (Tomonari S. et al., 2008)。今回の実験で、17日胚および孵化後10日のニワトリ網膜において、神経節細胞層に存在する大型の細胞およびアマクリン細胞層のいくつかの細胞集団に、cOpn5m陽性細胞が存在することが明らかになった。この結果は、先に報告したmRNAの局在部位と一致した。cOpn5mは、cOpn4mと異なり、発生後期網膜と孵化後網膜とでその発現細胞の存在部位が変化しないことがわかった。さらに、cOpn5mは、17日胚網膜において*GnaO1*および*GnaZ* mRNAを発現する網膜細胞の一部に存在していた。GnaO1, GnaZはGnai型サブファミリーのメンバーであり、Gnaqサブファミリーとは異なったグループに属する。従って、Opsin 5は、メラノプシンとは異なったタイプのGnaと共役し、GPCRとして機能している可能性が示唆された。Opsin 5は、分子系統樹上、レチナール異性化酵素と近縁であるが、光を受容してGタンパク質を活性化させることができるのか、Gタンパク質の活性化能はなく、レチナールの異性化のみを担うのか、これまで明らかにされていなかった。しかし、最近、我々は、cOpn5mが、紫外線域の光を受容してGnai型のGタンパク質を活性化させること、可視光域の光を受容してレチナールの異性化を再び行うことを見出した。さらに、cOpn5mは、網膜だけでなく視床下部や松果体にも存在しており、網膜以外での光受容を担っている可能性が示唆された。特に、視床下部におけるcOpn5mは、室傍器官 (paraventricular organ: PV0) と呼ばれる部位に局限して存在していた。PV0は、哺乳類以下の脊椎動物がもつ、光周性に関わる深部脳光受容器官であり、双極性の特徴ある光受容ニューロンが存在している。cOpn5mは、PV0の双極性ニューロンにセロトニンとともに存在することがわかった。PV0は、鳥類に特有の「日長に伴う精巣肥大」などの生理

機能に深く関与していることが知られ、cOpn5mがその光受容を仲介していると考えられた。今後は、cOpn5m発現光受容ニューロンの膜電位の変化や投射先など神経生理学・解剖学的な解析およびヒト・マウスなど哺乳類におけるOpsin 5の機能についても研究を進める予定である。

4. 考察とまとめ

ニワトリメラノプシンcOpn4mには、C末端構造の異なるいくつかのアイソフォームが存在する。光吸収特性についても他の研究グループにより調べられており、今回作製した抗体は、青色光を吸収することが確かめられたアイソフォームのC末端タンパク質部分を抗原としている。従って、発生後期網膜ですでにcOpn4mを介して青色光を受容しているとすれば、その機能はどのようなものであるか興味深い。また、本研究においては、ヒトへの応用（疾患の理解や、治療への応用）を念頭においた基礎研究を目指したので、哺乳類型メラノプシンに着目した。しかし、もう一つのニワトリメラノプシン（cOpn4）が、ニワトリでの「機能的」哺乳類型ホモログである可能性もあるので、cOpn4の研究も同時に進めていく必要がある。

最近の急速な研究展開により、メラノプシン発現網膜細胞と桿体・錐体視細胞間の相互作用が、非視覚性および視覚性光情報の修飾において重要であることが明らかにされている。そして、今回報告した新しい視物質であるOpsin 5もその発現部位から、睡眠や体温の維持、体液調節など視床下部機能に関連する可能性が示唆される。従って、Opsin 5も、これまでメラノプシンの主たる機能であると考えられてきた「動物の様々な行動や生理に影響を与える光」受容の機能を積極的に担っている可能性がある。桿体・錐体視細胞系、メラノプシン光受容細胞系、Opsin 5光受容細胞系の3つの光受容系が、脊椎動物の眼の網膜に存在することは特筆すべきことであり、視覚性光受容、第一非視覚性光受容（概日リズムの光同調と瞳孔反射）、第二非視覚性光受容（内分泌機能の光調節？）の3つの光受容機能を特定の網膜光受容細胞が担っていると想像している。これらの基礎的なデータを基に、今後、非視覚性視物質であるメラノプシンやニューロプシンの発生における役割について解明してゆきたい。

5. 発表論文

Opn5 is a UV-sensitive bistable pigment that couples with Gi subtype of G protein. *Yamashita T, *Ohuchi H, Tomonari S, Ikeda K, Sakai K, Shichida Y. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Dec 21; 107(51): 22084-22089. (*equally contributed)