

研究報告書

「哺乳類のUV感覚にせまる光センサー蛋白質の機能解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 小島 大輔

1. 研究のねらい

バクテリアからヒトまで、多くの生物は太陽光を直接もしくは間接的に利用して、外界の認識や生体機能の調節を行っている。ヒトの感じることのできる 400-770 nm の波長領域は可視光と呼ばれるが、これよりも短波長側の紫外線 (ultraviolet = UV) のうち、低傷害性の UVA 光 (315-400nm) を利用する生物も少なくない。例えばミツバチやアリなどの昆虫が UV 感覚をもつことは古くより知られており、花の識別やナビゲーション(太陽コンパス)に利用すると考えられている。一方、脊椎動物においてもキンカチョウやムクドリなどの鳥類においては、配偶者選択・雌雄識別・雛識別などの個体間コミュニケーションや、餌の追跡に UV 感覚を利用すると考えられている。ところが哺乳類においては UV 光受容の生理的な役割は明らかになっておらず、とくにヒトの場合には「UV 光センサー」は存在しないとさえ考えられてきた。それでは本当にヒトは UV 光を感知できないのだろうか？ 私は最近、マウスのゲノム上に存在する機能未知の光受容体遺伝子 *Opn5* の解析を行い、この遺伝子産物 OPN5 が UV センサー蛋白質として機能することを見出した。OPN5 は、ロドプシンなどの視物質を含む光センサー蛋白質ファミリー(オプシン類)のメンバーであるが、その分子機能は全くわかっていなかった。*OPN5* 遺伝子はヒトを含む広い動物種において維持されていることから、ヒトにおいても UV 受容を介して重要な生体機能に寄与する可能性があるとして着想した。

そこで本研究では、ヒト OPN5 の機能解析を通して「ヒトには UV センサーはない」という常識を覆すことに挑戦する。さらにマウスをモデルとして、OPN5 発現細胞を特定し、OPN5 発現細胞の UV 光応答を測定する。最終的には、遺伝子改変マウスを用いて OPN5 が関与する生理機能の同定を目指す。これらの研究を通じて、哺乳類の UV 光受容の生理的役割に迫る。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究ではまず、試験管内での再構成実験により、ヒト OPN5 が UV センサー蛋白質として機能することを明らかにした。このことから、ヒトにはこれまで知られていなかった UV 感知システムが存在し、OPN5 がこれを担っていると推定される。OPN5 蛋白質は、体表にある組織(網膜や耳介)のごく限られた細胞に存在することが、マウスを用いた実験から分かった。さらに、これらの細胞が実際に UV を感知しているかどうかを検証するため、生きた細胞の UV 応答をリアルタイム計測する測定系を確立した。今後、OPN5 の関わる生体機能を探索することにより、これまで知られていなかった UV 感知システムの役割が明らかになるものと期待される。一方、霊長類(ニホンザル)の *OPN5* 遺伝子の解析から、光センサー蛋白質をコードしない splicing variant mRNA の存在が明らかになった。霊長類へと至る進化の過程において、*OPN5* 遺伝子が(光センサーとは別の)何らかの機能を獲得したのではないかと推定された。

(2) 詳細

研究テーマ A 「再構成実験系によるヒト OPN5 タンパク質の機能解析」

ヒト OPN5 が UV センサー蛋白質かを検証するため、再構成実験系によるヒト OPN5 タンパク質の機能解析を行った。まず、ヒト OPN5 cDNA の発現ベクターを構築し、ヒト腎臓由来の培養細胞 (HEK293 細胞) において強制発現させ、組換えヒト OPN5 タンパク質を調製した。この組換えタンパク質の高純度精製を試みたが、機能解析に十分な量を得ることができなかった。そこで、(精製度は低い)が簡便かつ確実な方法でヒト OPN5 タンパク質を調製し、吸収スペクトル解析を行った。その結果、UV 照射によるヒト OPN5 の吸収スペクトル変化を測定することに成功し、ヒト OPN5 が UV センサー蛋白質であることを明らかにした (図 1)。

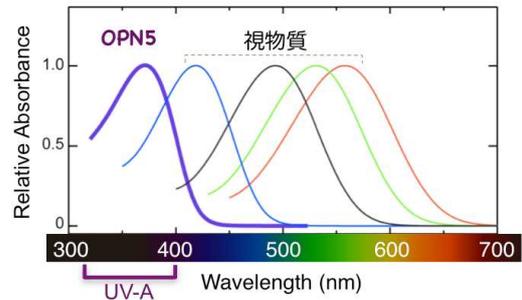


図 1. ヒト OPN5 は UV センサー蛋白質である

さらに、OPN5 が細胞内でどのような分子に光シグナルを伝達するかを検証した。OPN5 を含む膜試料を調製して UV 光を照射したところ、HEK293 細胞に内在する G タンパク質の活性化が検出された。G タンパク質はオプシン類や他のレセプター蛋白質などと相互作用して、シグナル伝達を行うタンパク質ファミリーであり、いくつかのサブタイプに類別される。この G タンパク質のサブタイプを同定するため、OPN5 ならびに cAMP 結合型ルシフェラーゼ (発光タンパク質) を HEK293 細胞に導入して、cAMP 濃度変化の測定を行った。この細胞に UV 光を照射したところ、cAMP 依存性の発光が減少したことから、OPN5 が Gi サブタイプの G タンパク質を介して cAMP 合成酵素を抑制すると考えられた。そこで、OPN5 と Gi を用いた再構成実験を試験管内で行ったところ、OPN5 が UV 光依存的に Gi を活性化することが明らかになった。

研究テーマ B 「マウス生体組織における OPN5 発現細胞の特定」

UV センサー蛋白質 OPN5 が生体内のどの組織、どの細胞に存在するかを特定するため、OPN5 抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。すでに私はマウス OPN5 に対する特異的な抗体の作製に成功し、またこれを用いたイムノブロット解析により、OPN5 が存在するマウス生体組織 (脳・眼球・耳介) を特定していた。これらのうち、「体表にあって UV 光受容する可能性が高い組織」として眼球と耳介を選び、これらの生体組織切片に OPN5 抗体を反応させた。その結果、OPN5 は (1) 網膜においては、視細胞以外のニューロン (神経節細胞・水平細胞・アマクリン細胞) の一部に存在すること (図 2)、(2) 耳介においては筋細胞や表皮細胞に存在すること、がわかった。さらに、OPN5 のシグナル伝達タンパク質 (Gi 型 G 蛋白質; 研究テ

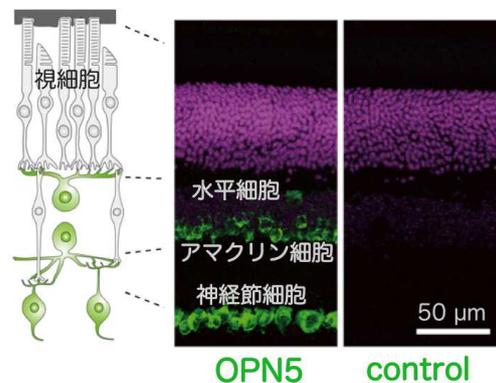


図 2. マウス網膜における OPN5 発現部位

一マ A 参照)も、OPN5 発現細胞に共局在することが明らかになった。この結果から、OPN5 は生体内においても Gi を介したシグナル伝達経路を駆動する可能性が高いと考えられる。

研究テーマ C 「OPN5 発現細胞の UV センシングの検証」

動物の体内で OPN5 が UV センサーとして機能することを検証するため、生きた細胞の UV 光応答をリアルタイム計測する測定系を確立した。一般的に、細胞が外部からの刺激に应答する際、細胞内の Ca^{++} 濃度が上昇することが多い。そこでまず、標的細胞に UV 光刺激を与え、かつ細胞内 Ca^{++} 濃度上昇を「単一細胞」でリアルタイム計測することのできる光刺激顕微鏡システムを構築した。このシステムを用

いて、培養細胞 (Neuro2A) をモデル細胞系として細胞内 Ca^{++} 濃度のイメージング測定を行った。細胞内 Ca^{++} 濃度の検出のため、長波長光 (585 nm: OPN5 の光反応と干渉しない) で励起される Ca^{++} 指示薬 X-rhod-1 を細胞内に導入した。OPN5 を強制発現させたモデル細胞系における UV 光刺激実験を行ったところ、380nm 光照射直後に細胞内 Ca^{++} 濃度が一過的に上昇することを、単一細胞レベルで検出することに成功した (図3)。OPN5 の UV 受容により Ca^{++} 応答が引き起こされると考えられる。

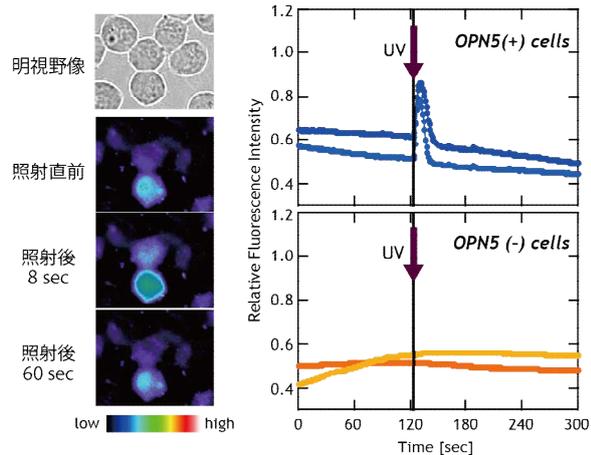


図 3. UV 刺激による OPN5 発現細胞の Ca^{++} 応答

一方、マウス生体において OPN5 発現細胞の UV 光応答を調べるため、OPN5 発現細胞が蛍光ラベルされた遺伝子改変マウス系統の作出を試みた。具体的には、*Opn5* 遺伝子の全領域を含む BAC-DNA ベクターを改変し、*Opn5* 遺伝子プロモータの直下に蛍光蛋白質 Venus 遺伝子を組み込んだ。この BAC-DNA ベクターをマウス胚に導入し、遺伝子組換えマウス1系統を樹立することに成功したが、残念ながら、Venus 由来の蛍光を検出することができなかった。そこで同様の遺伝子改変マウスをさらに2系統樹立した。これらのマウス系統において OPN5 発現細胞が蛍光ラベルされていれば、OPN5 発現細胞の UV 光応答実験に供することができるが、これは今後の課題として残された。

研究テーマ D 「マウス生体内での UV センシングの役割」

OPN5 がどのような生体機能に関与するかを解明するため、*Opn5* 遺伝子を破壊した遺伝子組換えマウス (OPN5-KO マウス) を作製した。研究テーマ B において特定された OPN5 発現細胞の情報にもとづいて、マウス生体において UV 応答を示すと考えられる生理現象を推定し、その測定系の構築を試みた。マウスにおける UV 生理現象の探索と、OPN5-KO マウスでこの UV 生理現象が消失するかどうかの検証は、今後の課題として残された。

研究テーマ E 「霊長類において OPN5 遺伝子を発現する生体組織の特定」

ヒトの OPN5 が体内のどこに発現しているのかを調べるため、様々な組織に由来する cDNA (cDNA アレイ) を用いて OPN5 の定量的 PCR 解析を行った。驚いたことに、(マウスでは検出さ

れていた)網膜では *OPN5* 発現は検出されず、精巣などの限局した組織のみに *OPN5* の発現が低レベルながら検出された。ただしこのヒト cDNA アレイは、全ての組織が網羅されていないことや、アレイ作製に用いられた検体の健康状態が不明であるなど、いくつかの問題を有していた。そこで、ヒトに近い霊長類モデルとしてニホンザルに実験対象を移し、*OPN5* 発現組織の特定を試みた。ニホンザルの様々な生体組織(京都大学霊長類研究所より提供)における *OPN5* 遺伝子の発現分布を調べたところ、マウスと同様に耳介において強い発現が確認され、これに加えて精巣や角膜にも比較的強い発現が検出された。ヒトの場合と同様に(かつマウスとは異なり)網膜における発現は検出されなかった。一方、この過程において、通常の *OPN5* タンパク質をコードする mRNA とは異なる、『splicing variant』 mRNA がニホンザル組織で検出された。この splicing variant mRNA は、通常の *OPN5* mRNA よりも圧倒的に発現量が高いが、オプシン型のタンパク質をコードしておらず、(光センサーとは異なる)何らかの機能を果たすと考えられた。さらに、この splicing variant がどのような動物種に存在するかを調べたところ、(1) 真骨魚類(ゼブラフィッシュ)や鳥類(ニワトリ)では殆ど検出されなかったが、(2) 齧歯類(マウス)では通常 mRNA とほぼ同じレベルで検出され、(3) 霊長類(ニホンザル)においては通常 mRNA よりも10倍以上高い発現量を示すことがわかった。霊長類へと至る進化の過程において、*OPN5* 遺伝子が(光センサーとは別の)何らかの機能を獲得したのではないかと推定された。

3. 今後の展開

本研究では、ヒト *OPN5* が UV センサーであることが明らかになり、これまで知られていなかった UV 感知システムがヒトに存在することが示唆された。今後は、この UV 感知システムが「どこで」「何のために」存在するかを明らかにしたい。具体的には、本研究で確立した光刺激顕微鏡システムを用いて、*OPN5* 発現細胞が生体内でも UV 応答することを示す。そのためには、*OPN5* 発現細胞が適正に蛍光ラベルされた遺伝子改変マウス系統が必要である。また、*OPN5* がどのような UV 生理現象に関与するかを解明するため、引き続き *OPN5*-KO マウスを用いた解析を続ける。さらに、この UV 生理現象がヒトにも存在するかどうかを調べることにより、医学・健康分野への応用へと発展させたい。また、本さがけ研究で新たに発見された *OPN5* splicing variant mRNA の解析を進めることにより、ヒトや霊長類における *OPN5* 遺伝子の新たな(光センサーとは別の)機能を明らかにしたい。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では *OPN5* がヒトの UV センサー蛋白質であることを世界にさががけて明らかにできた。これにより(当初のねらい通り)、ヒトにも UV 感知システムが存在することが強く示唆され、さががけ研究を進める上での強いモチベーションになった。また、マウス *OPN5* の発現細胞の同定や、単一細胞レベルでの *OPN5* の UV 応答の検出系の確立など、多くの成果を挙げることができた。しかし、当初より最も難しいと考えていた「*OPN5* の UV 応答がどのような生理現象に関与するか」という重要な問題については、残念ながら研究期間内に答えを出すことができなかった。ただし解決の糸口は掴みつつあり、これを当面の重要課題として現在も引き続き解析

を進めている。一方、霊長類の *OPN5* 遺伝子の解析から、当初は想定していなかった方向(霊長類における *OPN5* 遺伝子の機能多様化の可能性)にも研究が広がり、常識にとらわれない新たな展開を示すことができたと考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

昆虫が紫外線(UV)で“見ている”ことが知られている。昆虫より高等動物である鳥類でも UV センサーを持っている事も分かっていた。本さきがけ研究を開始する直前に小島研究者は、マウスのゲノム上に見出した光センサー遺伝子 *OPN5* により作られるタンパク質が、UV センサーとして機能していることを報告した。

本さきがけ研究では、この *OPN5* 遺伝子が人間にも存在し、試験管内での再構成実験により、ヒト *OPN5* が UV センサー蛋白質として機能することを明らかにした。マウスを用いた実験では、*OPN5* 蛋白質は、体表にある組織(網膜や耳介)のごく限られた細胞に存在することを実証した。一方、霊長類(ニホンザル)の *OPN5* 遺伝子の解析から、光センサー蛋白質をコードしない splicing variant mRNA の存在を示し、現在は、その機能解明にむけて研究中である。

新たな発見が、新たな疑問を生み出す典型のような研究展開となった。これまで認識されていなかった霊長類の *OPN5* 遺伝子の発見と、その遺伝子のスプライシングにより作られるタンパク質のバリエーションはいったい何のためなのか、興味のつきない課題に遭遇してさきがけ研究を終了した。さきがけ研究らしい研究展開であり、今後もパイオニアとしてこの研究領域を開拓してもらいたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Daisuke Kojima*#, Suguru Mori*, Masaki Torii*, Akimori Wada, Rika Morishita, Yoshitaka Fukada# (*equally contributed; #Correspondence): UV-sensitive photoreceptor protein *OPN5* in humans and mice. PLoS ONE, 6, e26388 (2011).

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

著書(総説): 1 件

1. Daisuke Kojima, Yoshitaka Fukada: Molecular mechanisms of the function of pineal organs. in “Vertebrate Photoreceptors: Functional Molecular Bases” (T. Furukawa, J. B. Hurley, S. Kawamura, eds.) Springer Japan, Tokyo, Japan; in press.

学会発表(国際会議における招待講演): 3 件

1. Daisuke Kojima: Non-visual photoreception in vertebrates, in the symposium “Evolutionary Biochemistry and Physiology of Photoreception in Animals.” The 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB2011),

Nagoya, JAPAN, June 4, 2011.

2. Daisuke Kojima: OPN5, a photosensory protein for mammalian ultraviolet photoreception. The 12th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology, Fukuoka, Japan, July 9, 2012.
3. Daisuke Kojima: Photic regulation of body colour in zebrafish. The 6th Asia & Oceania Conference on Photobiology, Sydney, Australia, November 11, 2013.

その他の学会発表:

国際会議(口頭発表およびポスター発表): 3 件

国内会議(口頭発表およびポスター発表): 7 件