

論文内容の要旨

論文題目

Molecular properties and G-protein coupling of non-visual opsins expressed in neural tissues

(神経組織に発現する非視覚性オプシン型光受容分子の性状と G 蛋白質シグナリング)

氏名 鳥居 雅樹

動物のもつ光受容分子には、ロドプシン類とクリプトクローム類の2種類のファミリーが知られているが、脊椎動物においてはロドプシン類のみが光受容能をもつ分子として同定されている。ロドプシン類は、アポ蛋白質であるオプシンが発色団としてレチナール（ビタミン A アルデヒド）と結合することにより光受容能を獲得し、光依存的に G 蛋白質シグナリングを活性化することにより光受容分子としての機能を発揮する。ロドプシンを代表とする視物質は、桿体と錐体の2種類の視細胞に存在する視覚機能の光センサーであり、これまで精力的に分子機能の解明が進められてきた。一方、このような視物質とは発現場所や分子の相同性を異にするオプシン類がここ 15 年ほどで多数発見されている。このようなオプシンは「非視覚性」オプシンと総称されるが、それらの生理的役割については未知の部分が多く残されている。また、G 蛋白質シグナリングをはじめとする分子機能についても、分子系統関係から類推されるにとどまっており、これら非視覚性オプシンが本当に光受容分子として機能するのか否かも含めて検討するべき課題は多い。そこで本研究では、非視覚性オプシンの分子機能を明らかにするため、組換え蛋白質の強制発現系を構築し、これらの問題にアプローチした。

非視覚性オプシンのうち、今日までのところ生理機能に関する研究が最も進められているのはメラノプシン (OPN4) である。メラノプシンは硬骨魚類から哺乳類まで脊椎動物に広く保存されたオプシンであり、特に哺乳類においてノックアウトマウスをはじめとした発生工学的な手法による研究が精力的に進められた。その結果、哺乳類のメラノプシンは、視細胞における光受

容と共同して概日時計の光リセットに寄与していることが明らかとなっている。本研究では、概日時計の光リセットに関わる G 蛋白質サブタイプについての知見が得られているニワトリ松果体に着目して *OPN4* 遺伝子の発現を探索したところ、2種類の *OPN4* の発現を見出し、それぞれを *cOPN4-1* と *cOPN4-2* と命名した。分子系統学的な解析の結果、*cOPN4-2* は哺乳類型であるのに対し、*cOPN4-1* は哺乳類の *Opn4* とは別のクラスターを形成する重複遺伝子であり、この遺伝子重複は脊椎動物の共通祖先で起こったと推定された。これら2種類のメラノプシンの分子機能を明らかにするため、培養細胞 HEK293T 細胞に強制発現させた。これまで視物質の解析に用いられてきた方法では充分量の組換え *OPN4* を得ることができなかったが、発色団と推定される 11 シス型レチナールを培養液に添加して再構成を試みたところ発現量が大幅に増加し、生化学的解析が可能なレベルにまで達した。

このような方法により強制発現・再構成した2種類の *OPN4* を含む細胞から、密度勾配遠心法により膜面分を精製した。この膜面分から界面活性剤 dodecyl maltoside により *OPN4* を抽出し、分光学的解析に供した。橙色光の照射により褪色する成分を差吸収スペクトル法により分析したところ、*cOPN4-1* と *cOPN4-2* いずれの試料についても光照射にともなって青色の領域において色素の褪色がみられた (図1)。このことから、2種類の *OPN4* はいずれも 11 シス型レチナールと結合して青色感受性の色素を生成すると結論された。得られた差吸収スペクトルの吸収極大波長は、*cOPN4-1* の場合は 476 nm であり、*cOPN4-2* の場合は 484 nm であった。この吸収極大波長は、哺乳類の *OPN4* 陽性の網膜神経節細胞における光応答から推定される極大波長とよく一致し

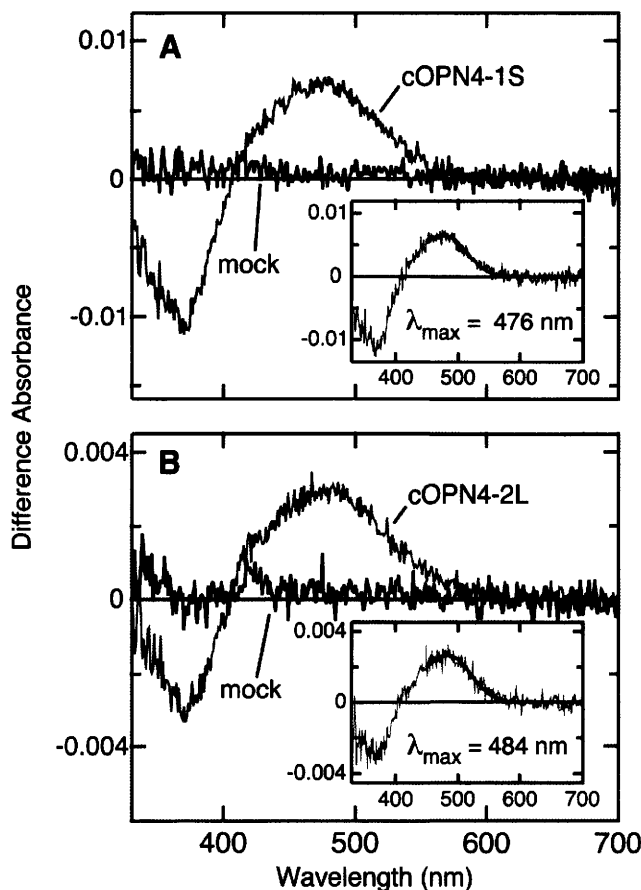


図1 2種類の *OPN4* の差吸収スペクトル

HEK293T 細胞に強制発現・再構成した *OPN4* を界面活性剤で抽出し、橙色の光を照射した。照射前の吸収スペクトルから照射後を差し引いた差吸収スペクトルを示す (図中 *cOPN4-1S* と *cOPN4-2L*)。空ベクターを用いて同様の実験から得られた差スペクトル (mock) を差し引くことにより、HEK293T 細胞に内在する成分の寄与を差し引いた。このようにして *OPN4* 由来の正確な差スペクトルを計算し、吸収極大を求めた (内挿)。

ていた。組換え OPN4 の光感受性については、これまで複数の研究例が報告されているものの、その多くは細胞からの光応答の検出にとどまり、またその色感受性が天然の OPN4 陽性細胞と異なるなどの問題があった。そのような中、本研究では蛋白質の光感受性を分光学的に直接測定することにより、OPN4 の青色感受性をはじめて蛋白質レベルで明らかにした点で意義深い。また、天然の OPN4 陽性細胞と同様の波長感受性を示す OPN4 の組換え蛋白質の調製が可能になったことで、OPN4 の生化学的解析に道が拓けた点も重要である。

ニワトリの松果体には、光により作動すると推定される G 蛋白質経路が G_t 経路と G_{11} 経路の 2 種類存在する。 G_t 経路はメラトニンの合成を急性に抑制する一方、 G_{11} 経路は松果体に内在する概日時計の位相シフト（リセット）を引き起こす。 G_t 経路は、松果体に存在するもう 1 つの光受容分子ピノプシンにより活性化されることが知られており、一方、分子系統学的な推察から、OPN4 が G_{11} 経路を活性化することが示唆される。しかし、これまでのところ脊椎動物に存在する 2 種類の OPN4 の G 蛋白質特異性が実験的に検討された例はない。そこで、2 種類の OPN4 の組換え蛋白質を用いて、 G_t と G_{11} のいずれの G 蛋白質を活性化するかを検討した。

各オプシンを発現させた HEK293T 細胞の膜画分と、 G_{11} の重複遺伝子である G_q の精製標品、もしくはウシ網膜より精製した G_t を用いて GTP γ S 結合アッセイを行った。分子系統樹からの予想通りピノプシンは G_q を活性化せず、OPN4-1 は G_q を活性化した。したがって、松果体の G_{11} 経路は OPN4-1 により光依存的に活性化されると考えられる。一方、OPN4-2 は G_q を活性化せず、 G_t を活性化した。OPN4-2 による G_t の活性化は、ピノプシンに比べてはるかに弱い。OPN4 はピノプシンとは異なり光により褪色しにくい性質をもつことを考えると、OPN4-2 はピノプシンに比べてより明るい光の識別に寄与していると推測される。また、OPN4-2 は 293T 細胞に内在する G 蛋白質を活性化した。この活性化は、OPN4-2 を発現させた細胞をあらかじめ百日咳毒素で処理すると消失することから、OPN4-2 は G_t を含む G_i/G_o サブタイプの G 蛋白質を活性化すると結論される。脊椎動物と最も近縁な動物のうちの 1 つであるナメクジウオにおいて、メラノプシンが G_q 活性化能を有することが示されている。したがって、OPN4 サブファミリーの共通祖先は G_q を活性化するが、脊椎動物の *Opn4* の遺伝子重複によって生じた OPN4-2 は、新たな G 蛋白質特異性を獲得したと推定され、分子系統樹からは予測されなかった新たな分子機能を本研究により実証することができた。

表 G 蛋白質の光依存的な活性化のまとめ

	ピノプシン	OPN4-1	OPN4-2
G_q	-	+	-
G_t	++	-	+
$G_{i/o}$ ¹	-	-	+

¹HEK293T 細胞に内在し、百日咳毒素に感受性をもつ G 蛋白質