

141. メラノプシンを用いたカルシウムシグナリングの光制御

塚本 寿夫

自然科学研究機構 分子科学研究所 生命・錯体分子科学研究領域

Key words : メラノプシン, カルシウムシグナリング, オプシン, 生体リズム

緒 言

動物は光情報を様々な生理機能に利用しており、特定の事物の色・かたち・動きを高い時空間分解能で感知する視覚のみならず、光環境に応じて概日時計をリセットすることや、瞳孔径の調節など「非視覚」の光受容機能にも用いている。このような非視覚の光受容機能については、哺乳類の場合、桿体・錐体視細胞に加えて、網膜神経節細胞からの光入力が必要である。具体的には、網膜神経節細胞の一部に光受容能を持つものがあり、その細胞（光感受性神経節細胞と呼ばれる）からの光入力によって、概日時計や瞳孔径が調節される¹⁾。そして、光感受性神経節細胞においては、メラノプシンと呼ばれる光受容タンパク質が発現することで、光受容能が成り立っている。

メラノプシンは、桿体・錐体視細胞で光受容を担う視物質と同じく、オプシンファミリーに属する光受容タンパク質で、ビタミン A の誘導体レチナールを発色団として結合することで、光を受容できる²⁾。興味深いことに、メラノプシンは分子系統的には、脊椎動物の視物質よりも無脊椎動物の視物質により近縁であり（図 1、A 参照）、光受容に伴い Gq タイプの G タンパク質を活性化する。活性化された Gq は、ホスホリパーゼ C の活性化を介して細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こすため、メラノプシンは細胞内カルシウムシグナリングを光によって制御する、いわゆるオプトジェネティクス（光遺伝学）ツールとしても注目されている³⁾。すなわち、哺乳類メラノプシンが持つ分子特性を明らかにすることは、哺乳類における「非視覚」の光受容機能の理解を深めるとともに、オプトジェネティクスツールとしてメラノプシンを使う上でも重要であると考えられた。

本研究では、哺乳類（ヒト・マウス）メラノプシンの分子特性を分光学的・電気生理学的に解析し、この光受容タンパク質がもつ特徴的な分子特性を明らかにしたので報告する。

方 法

1. ヒトおよびマウスのメラノプシンに加えて、比較対象として脊椎動物に近縁な無脊椎動物である頭索類ナメクジウオのメラノプシン⁴⁾、無脊椎動物ハエトリグモの視物質（ロドプシン）⁵⁾（図 1、A）を、それぞれ哺乳培養細胞で大量発現し、抗ロドプシン抗体を結合したカラムを用いて精製した。精製した各タンパク質を、哺乳類の体温に近い 37℃で保持したときに、発色団レチナールを放出していく反応が見られるかを、可視吸収スペクトルの変化から解析した。

2. レチナールとの結合の安定性に大きな違いが見られた、ヒトとマウスのメラノプシンの間で異なるアミノ酸配列（残基）を相互に交換した変異タンパク質を解析し、具体的にどの部位が、発色団の放出しやすさの違いを生み出しているのか調べた。

3. ヒトとマウスのメラノプシンをアフリカツメガエル卵母細胞に強制発現させて、光を細胞に照射した時の細胞応答を電気生理学的に調べた。さらに、メラノプシン特異的に結合するアンタゴニスト（光に応答しない）存在下で、37℃で保持した時に、その電気応答がどのように変化するかを調べた。

結果

1. 精製タンパク質を哺乳類の体温に近い 37 °C で保持したところ、ヒト・マウスのメラノプシンでは経時的に発色団のレチナールを放出する反応が見られたが、このような現象はナメクジウオメラノプシンやハエトリグモロドプシンでは見られなかった (図 1B-E)。すなわち、哺乳類メラノプシンではレチナールとの結合が弱められており、発色団を自発的に切断することで、光受容能を失っていく特性があることが見出された。また、ヒトとマウスのメラノプシン間でもレチナールとの結合の安定性は大きく異なり、ヒトメラノプシンでは特に弱められていることがわかった (図 1、F)。

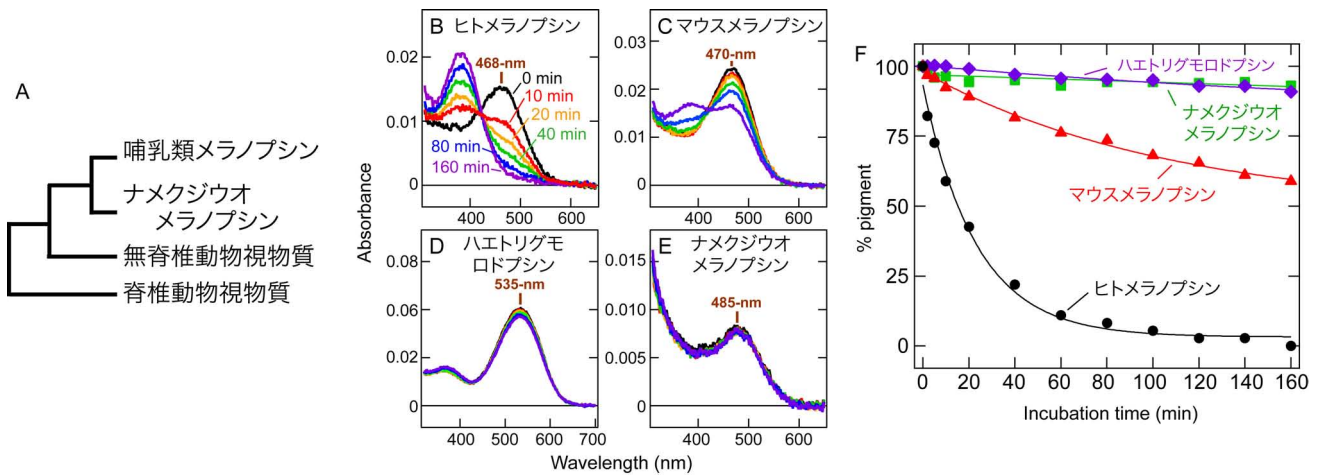


図 1. 哺乳類メラノプシンにおけるレチナールとの結合の不安定性

(A) メラノプシンの分子系統関係の模式図。(B-E) 精製したヒトメラノプシン (B)、マウスメラノプシン (C)、ハエトリグモロドプシン (D)、ナメクジウオメラノプシン (E) を 37 °C に保持した際の経時的な吸収スペクトルの変化。哺乳類メラノプシンで見られる 470 nm 付近の可視部における吸光度の減少と 380 nm 付近の紫外部における吸光度の増加は、レチナールとの結合を自発的に切断していることを示している。(F) 37 °C に保持した時間と、レチナールを結合しているタンパク質の残存割合のプロット。

2. 上述したように、ヒトとマウスのメラノプシンはよく似たアミノ酸配列 (85 % 程度の一一致度) を持つにもかかわらず、発色団レチナールの結合安定性が大きく異なることがわかった。そこで、両者で異なるアミノ酸残基 (配列) を交換した変異タンパク質を用いて、1 と同様の実験を行った。その結果、N 末端領域の配列と、2 番目と 3 番目の膜貫通ヘリックスをつなぐループ部分に位置する 96 番目、102 番目のアミノ酸残基を交換すると、ヒトメラノプシンではレチナールの結合が安定化し、マウスメラノプシンでは不安定化した (図 2A、B)。すなわちこれら細胞外領域 (図 2C) のアミノ酸配列の違いによって、ヒトとマウスのメラノプシン間の発色団の自発的切断のしやすさが異なっていることがわかった。

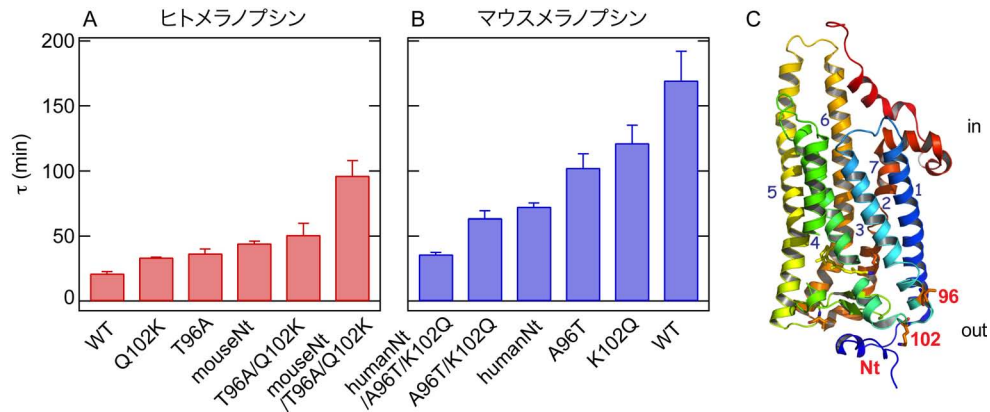


図2. ヒトとマウスのメラノプシン間のレチナール結合安定性の違いを生み出すアミノ酸配列

(A) ヒトメラノプシンにマウスメラノプシンの配列を導入した時のレチナールとの結合安定性の変化。マウスメラノプシンの N 末端配列 (mouseNt)、96 番目、102 番目のアミノ酸残基を導入した時の 37 °C におけるレチナール放出反応の時定数を示した。(B) マウスメラノプシンにヒトメラノプシンの配列を導入した時のレチナールとの結合安定性の変化。ヒトメラノプシンの N 末端配列 (humanNt)、96 番目、102 番目のアミノ酸残基を導入した時の 37 °C におけるレチナール放出の時定数を示した。パネル A、B において、エラーバーは標準偏差を表し、WT は野生型を意味する。(C) メラノプシンに近縁なイカロドプシンの結晶構造 (PDB ID: 2Z73) における、N 末端部位、96、102 番目のアミノ酸残基の位置。

3. 哺乳類メラノプシンが細胞内で光によってカルシウムシグナリングを駆動できるかどうかを確認するとともに、メラノプシンによる細胞の光応答にレチナールの結合安定性がどのように関わるのかを調べた。まずマウス・ヒトメラノプシンをアフリカツメガエルの卵母細胞に強制発現させて、レチナールを添加すると、光刺激に応じて、 Ca^{2+} 作動性 Cl^- チャネル由来の電流応答が生じた (図 3A、B)。すなわち、これらのメラノプシンは光によって細胞内カルシウムシグナリングを駆動する能力があることが確認できた。さらに、レチナールを結合させた後、メラノプシン特異的アンタゴニストである AA92593⁶⁾ を添加した条件で卵母細胞を 37 °C で 90 分保持すると、マウスメラノプシンの場合は、アンタゴニスト非存在下と光応答に違いは生じなかったが、ヒトメラノプシンにおいては、アンタゴニストの添加によって光応答電流が 4 割程度減少した (図 3C-E)。このことは、細胞内においても、ヒトメラノプシンからレチナールが放出されやすく、アンタゴニストとの交換が起きていることを示していた。

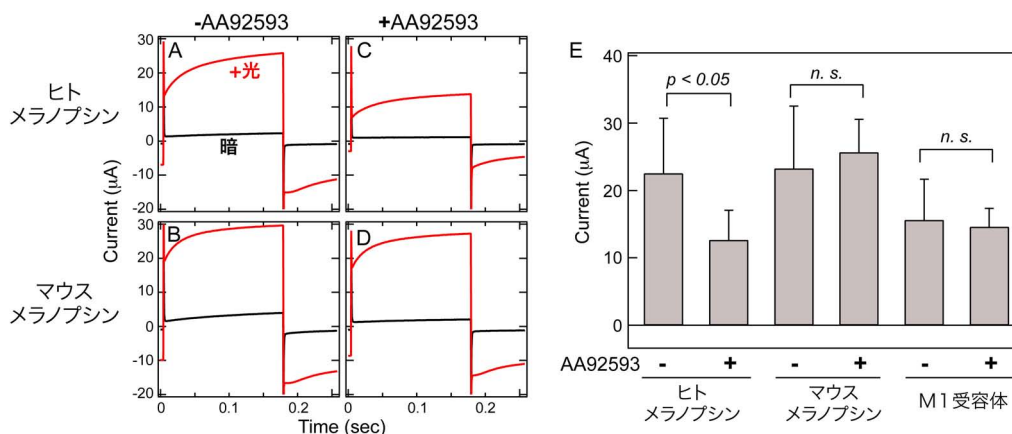


図3. アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたヒト・マウスメラノプシンが駆動する光応答

(A-D) メラノプシン特異的アンタゴニスト AA92593 が存在しない条件で、ヒトメラノプシン (A) あるいはマウスメラノプシン (B) を発現させた卵母細胞に光刺激した時の電流応答ならびに、AA92593 存在下で、ヒトメラノプシン (C) あるいはマウスメラノプシン (D) を発現させた卵母細胞に光刺激した時の電流応答。ヒトメラノプシンにおいては、レチナールが放出され AA92593 に置換する反応が起きやすいために、光応答が小さくなっている。(E) AA92593 存在下 (+)、非存在下 (-) における電流応答の大きさのプロット。M1 受容体はムスカリン作動性アセチルコリン受容体を発現させた卵母細胞の結果を示している。p 値は、Student's t test および Wilcoxon test での値を表し、"n. s." はこれらの統計処理で有意な差が見られなかったことを表す。

考 察

今回行った解析から、哺乳類メラノプシンが持つ発色団レチナールを自発的に放出するという特性が明らかになった。この特性は、光感受性網膜神経節細胞における実効 (光受容能を持つ) メラノプシン密度を下げることで、光感度を低下させて、外界からの強い光入力にも応答が飽和しないようにすることに寄与していると考えられた⁷⁾ (例えばマウスの場合、光感受性神経節細胞は視細胞より 1 万倍以上光感度が低い¹⁾)。また、ヒトメラノプシンが持つ、熱を加えると容易にレチナールを放出するという特性は、細胞内カルシウムシグナリングを光制御するツールとして有用であると考えられる。なぜなら、細胞内カルシウム濃度が過度に上昇してしまうと細胞毒性があることが知られており、ヒトメラノプシンを研究対象の細胞に発現させて、まず熱刺激を加えてから光刺激を加えることで、細胞内カルシウム濃度を「適度に」上昇させることができる可能性があるからである。また、熱刺激と光刺激する部位を組み合わせることで、メラノプシンを発現させた部位 (組織) の中でもごく一部だけ特異的にカルシウムシグナリングを駆動させることができる可能性についても期待される。

共同研究者

本研究は、分子科学研究所生体分子情報研究部門の古谷祐詞准教授、生理学研究所神経機能素子研究部門の久保義弘教授、大阪市立大学大学院理学研究科の寺北明久教授、小柳光正准教授、Oregon Health & Science University の David Farrens 准教授との共同研究として行われた。共同研究者の先生方からの、研究立案から論文作成までの御指導・御協力に御礼申し上げます。また、本研究の遂行にご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Do MT, Yau KW. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Physiol Rev.* 2010 90: 1547-81. doi: 10.1152/physrev.00013.2010. PMID: 20959623.
- 2) Tsukamoto H. Diversity and functional properties of bistable photopigments. in "Evolution of Visual and Non-visual Pigments" edited by Hunt DM, Hankins MW, Collin SP, Marshall NJ. Springer, New York. 219-239. doi: 10.1007/978-1-4614-4355-1_7.
- 3) Ye H, Daoud-El Baba M, Peng RW, Fussenegger M. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science.* 2011 332: 1565-8. doi: 10.1126/science.1203535. PMID: 21700876.

- 4) Koyanagi M, Kubokawa K, Tsukamoto H, Shichida Y, Terakita A. Cephalochordate melanopsin: evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells. *Curr Biol*. 2005 15: 1065-9. PMID: 15936279.
- 5) Nagata T, Koyanagi M, Tsukamoto H, Saeki S, Isono K, Shichida Y, Tokunaga F, Kinoshita M, Arikawa K, Terakita A. Depth perception from image defocus in a jumping spider. *Science*. 2012 335: 469-71. doi: 10.1126/science.1211667. PMID: 22282813.
- 6) Jones KA, Hatori M, Mure LS, Bramley JR, Artymyshyn R, Hong SP, Marzabadi M, Zhong H, Sprouse J, Zhu Q, Hartwick AT, Sollars PJ, Pickard GE, Panda S. Small-molecule antagonists of melanopsin-mediated phototransduction. *Nat Chem Biol*. 2013 9: 630-5. doi: 10.1038/nchembio.1333. PMID: 23974117.
- 7) Tsukamoto H, Kubo Y, Farrens DL, Koyanagi M, Terakita A, Furutani Y. Retinal attachment instability is diversified among mammalian melanopsins. *J Biol Chem*. 2015 290: 27176-87. doi: 10.1074/jbc.M115.666305. PMID: 26416885.