松果体波長識別の分子基盤に関する分子生理学的解析と進化的考察

山下(川野) 絵 美*

動物は、光を物の形や色を認識する「視覚」で利用するのに加え、生体リズムの制御などの様々な「視覚以外(非視覚)」の生理機能の調節に用いている。哺乳類を除く多くの脊椎動物において、非視覚の光受容には、松果体や脳深部などの、眼以外の光受容器官の関与が広く知られている。下等脊椎動物の松果体やその関連器官は、環境光の明暗だけでなく、波長成分(色)を検出できる(波長識別応答)。著者らは、ヤツメウナギ松果体において、波長識別応答に関わるUV光受容タンパク質としてパラピノプシンを同定した。これまでにやってきた生化学的、分光学的、組織化学的、電気生理学的解析から、パラピノプシンは、松果体波長識別の分子基盤の解明のためだけでなく、その特徴的な分子特性から、脊椎動物の視覚オプシンの分子進化を考える上でもカギとなる分子であることが分かってきた。ここでは、松果体UV光受容タンパク質パラピノプシンに関する著者らの研究成果を中心に、松果体やその関連器官における波長識別とオプシンの分子進化に関する知見を紹介する。

1. はじめに

松果体は、脊椎動物で広く保存された脳内器官であり、発生過程で間脳の背側部の膨出により形成される³⁰⁾。多くの場合、松果体は、頭蓋骨の直下に位置する間脳の背側に存在する(図1 A, B)。松果体は、頭蓋骨や皮膚組織などの、光の通過を妨げるような組織で覆われているものの、それらの組織を通過して減光された場合でも、松果体で光受容するのに十分な強度の光が届いていると考えられている⁶⁾。

哺乳類を除く多くの脊椎動物の松果体は、松果体光受容細胞・神経節細胞・グリア細胞などから構成される。松果体光受容細胞は、後述するように、メラトニンの合成・分泌を行う光受容細胞(神経内分泌性光受容細胞と呼ばれる場合もある)と神経性の光応答を示す光受容細胞(典型的な光受容細胞と呼ばれる場合もある)の2種類に大別される。これらの松果体光受容細胞は、光受容能を持たない哺乳類のメラトニン分泌細胞と合わせて、松果体細胞と呼ばれる場合もある。松果体光受容細胞の形態はさまざまで、形質膜の折りたたみから形成される外節構造など、眼の視細胞に類似した形態的特徴を持つものや、外節が退化した形態を示すものが存在する。それらの光受容細胞の外節には、視覚で機能しているものと同じオプシンや非視覚で機能しているオプシンなど、多様な光受容タンパク質が存在し、様々な波長(色)の光を受容している。中でも、ニワトリ松果体の光受容細胞で見出されたピノプシンは、初めての非

図1 ヤツメウナギ松果体 (A) ヤツメウナギ頭部の写真。頭頂部の丸く色素が抜けた松果体窓(矢尻)の真下に松果体がある。(B) ヤツメウナギ脳の模式図。松果体(矢尻)は間脳の背側に位置する。(C) ヤツメウナギ松果体と副松果体の模式図。T: 終脳, D: 間脳, M: 中脳, R: 菱脳, L: 内腔。

視覚型オプシンとして注目されてきた²⁹⁾。一方で、哺乳類の松果体細胞は、タンパク質部分であるオプシンを含んでいるものの、光受容タンパク質として機能するための発色団レチナールが供給されないために、光受容能は持たないと考えられている¹⁵⁾。また、松果体と類似した器官(松果体関連器官)の存在も知られている^{10, 30)}。円口類・魚類における副松果体(図1 C)や、両生類カエルの前頭器官、爬虫類トカゲの頭頂眼といった松果体関連器官にも、松果体で見られるような光受容細胞が多数存在し、直接光を受容する。

本稿では、下等脊椎動物の松果体やその関連器官で機能する光受容タンパク質に着目し、それらの光受容メカニ

* Emi KAWANO-YAMASHITA, 大阪市立大学大学院理学研究科 (〒558-8585 大阪市住吉区杉本3-3-138)

Received 2 December 2014, Accepted 2 February 2015

ムと神経性の光応答やメラトニンの合成・分泌との関係について概説すると共に、波長識別においてUV光受容を担う光受容タンパク質パラピノプシンに関する研究成果について紹介する。

2. 松果体とその関連器官の光受容

2-1. メラトニン合成・分泌に関わる光受容

松果体では、概日リズムの制御に関わるメラトニンが暗期に多く合成・分泌され、明期ではその合成・分泌量が少なくなることが知られている⁸⁾。哺乳類では、メラトニン合成を制御する光情報は、眼で受容され、中枢時計が存在する視交叉上核 (SCN) などを介して、松果体にまで伝達される。一方で、哺乳類以外の多くの脊椎動物では、メラトニン合成・分泌に関わる松果体の細胞が直接光を受容する²⁾。

メラトニン合成に関与する光受容タンパク質について、免疫組織化学的解析から、ヤツメウナギの松果体では、赤感受性の錐体オプシンが主に機能することが示唆されている^{38, 40)}。トカゲやカエルの松果体でも赤錐体オプシンが免疫組織化学的に検出されていることから²²⁾、メラトニン合成の制御には赤色光が重要であると推測された。ニワトリ松果体においては、赤錐体オプシンに加えて、468 nmに吸収極大をもつ青色光感受性のピノプシンが光依存的なメラトニンの合成・分泌の制御に関わることが示され、視物質以外の光受容タンパク質の関与が初めて明らかになった^{28, 29)}。メラトニン合成の光による制御メカニズムには、光による急速な抑制経路に加えて、メラトニン合成リズムが環境光の明暗周期に同調するために、光情報が概日時計の振動体へ入力する経路がある。近年、ニワトリ松果体にメラノプシンが発現することも報告されており¹⁾、ピノプシンとメラノプシンが協調して機能するのかどうかを含め、その制御メカニズムは大変興味深い。

2-2. 松果体とその関連器官の神経性光応答に関わる光受容

松果体には、前述のメラトニン合成・分泌に関わる光受容細胞に加えて、神経性の光応答を示す松果体光受容細胞も存在する。円口類・魚類・両生類・爬虫類などの下等脊椎動物では、松果体やその関連器官において、松果体光受容細胞でキャッチした光情報を電気信号に変換し、神経節細胞で情報統合し、中枢へと伝達するという神経性の光応答機構がある^{4, 5, 24)}。これらの神経性光応答は神経節細胞で検出されるが、その光応答の特徴の違いから、明暗応答と波長識別応答の2種類に分類される(図2)。円口類ヤツメウナギなどの松果体を用いて、神経節細胞からの電気応答を調べると、暗状態では継続して神経発火が記録されるが、可視光を照射すると、ある神経節細胞から一過的に神経発火を抑制するような光応答が記録される(図2A)。この神経節細胞は、どの波長の可視光刺激に対しても同様に抑制性の応答を示すことから、光の明暗の検出に関与する(明暗応答、非感色性応答)と理解されている。一方で、ある神経節細胞からは、紫外光(UV光)を照射すると神経発火を抑制、可視光を照射すると増大するような光応答が記録される(図2B)。この神経節細胞は、照射光中のUV光と可視光の比率を検出しており、光の波長成分(色)の情報をモニターしていると言える(波長識別応答、感色性応答)。

図2 ヤツメウナギ松果体の神経節細胞における2種類の神経性応答の模式図 (A) 明暗応答(非感色性応答)を示す神経節細胞。可視光で抑制性の光反応を示す。(B) 波長識別応答(感色性応答)を示す神経節細胞。可視光で興奮性、UV光で抑制性の光反応を示す。

このように、2種類の神経節細胞は、光依存的な神経発火の頻度の違いによって、明暗や色の光情報を脳へと伝達している。

松果体光受容細胞と神経節細胞の関係については、ヤツメウナギの松果体でよく調べられている^{12, 25)}。ヤツメウナギ松果体を用いた電気生理学的解析から、緑色光感受性の松果体光受容細胞と、明暗検出に関わる神経節細胞は、共に525 nmに最大感度を持つことが示された⁴⁶⁾。さらに、培養細胞系で発現させたヤツメウナギロドプシンに、松果体で多く検出される11-*cis*型3-デヒドロレチナール(A2レチナール)を結合させて再構成し、分光学的解析を行った場合、525 nmに吸収極大を持つような吸収スペクトルが得られ¹²⁾、電気生理学的に得られた緑色光受容細胞の波長感受性と一致した。これらの知見を考え合わせると、ヤツメウナギロドプシンを含む可視光受容細胞が、明暗検出する神経節細胞の神経発火を制御していることが考えられる。

一方で、ヤツメウナギ松果体において、波長識別応答を示す神経節細胞は、抑制性応答が380 nm、興奮性応答が540 nmに最大感度を示すと報告されている⁴⁵⁾。つまり、緑色光などの可視光は、明暗検出と波長識別応答に関わる光受容細胞の両方の応答を引き起こすのに対し、UV光は波長識別にかかわる光受容細胞のみを刺激すると言える。

3. 松果体とその関連器官における波長識別応答

3-1. 松果体の波長識別に関わるUV光受容タンパク質

先行研究における発色団レチナールの解析に基づき、ヤツメウナギの松果体には、UV光と可視光の間で可逆的に光反応するような、脊椎動物の視覚オプシンとは異なる分

子特性を持つ新規のUV オプシンが存在することが示唆されていた³⁹⁾。実際に、著者らがヤツメウナギの松果体や眼で発現するオプシン遺伝子の単離を行った結果、ロドプシンや赤錐体オプシンは単離されるが、UV/紫オプシンググループに分類されるUV オプシンは単離されなかった¹⁶⁾。しかし、さらに詳細に調査した結果、ナマズの松果体や副松果体に遺伝子発現が明らかにされていた「パラピノプシン」と呼ばれる非視覚オプシン³⁾が、松果体で機能するUV オプシンであることが示唆された。具体的には、培養細胞系で発現させたヤツメウナギパラピノプシンに、松果体で多く検出される11-*cis*型3-デヒドロレチナール(A2レチナール)を結合させて再構成し、分光学的解析を行った場合、370 nmのUV光領域に吸収極大を持つような吸収スペクトルが得られた¹⁶⁾。さらに詳細な分光学的解析から、パラピノプシンは、脊椎動物の視覚オプシンとは異なり、無脊椎動物の視覚オプシンと類似した分子特性を持つことが明らかとなった(後述)。

パラピノプシンが、実際にヤツメウナギ松果体のUV光受容細胞で機能するのか、電気生理学的解析と免疫組織学的解析を組み合わせて検討した。つまり、細胞内記録法で、松果体のUV光受容細胞から電気生理応答を記録すると、380 nmに最大感度を示す過分極性の光応答が得られた¹⁶⁾。この波長感受性は、分光学的測定によるパラピノプシンの吸収極大波長と一致している(図3 A)。さらに、記録後に色素を注入した光受容細胞が抗パラピノプシン抗体で染色されたことから¹⁶⁾、ヤツメウナギ松果体のUV光受容細胞ではパラピノプシンが機能することが示唆された。さらに、パラピノプシンは松果体にもみ発現しており¹³⁾、ヤツメウナギ松果体のUV光受容は波長識別応答にのみ関与すると考えられるので、パラピノプシンが波長識別の分子基盤であることが推定された。

3-2. ヤツメウナギ松果体のパラピノプシンを含むUV光受容細胞の特徴

パラピノプシンがキャッチしたUV光情報が、どのように波長識別応答を示す神経節細胞へ伝達されるのかを理解するためには、パラピノプシンを含む光受容細胞の松果体内での局在やそれらの神経節細胞への投射などの組織学的知見が重要である。

1) パラピノプシン発現細胞の局在

ヤツメウナギ松果体において、パラピノプシンと、既知の可視光受容タンパク質であるロドプシンの局在を免疫組織化学的に比較したところ¹³⁾、ロドプシンは松果体の腹側領域に局在しているのに対して、パラピノプシンは松果体の背側領域に局在していることが明らかになった(図3 B)。背腹軸の境界領域にあたる松果体の周縁部においては、パラピノプシンとロドプシンの両方が局在するが、両者が同じ光受容細胞で共局在することはなかった。

2) パラピノプシン発現細胞間のギャップ結合

パラピノプシンを含むUV光受容細胞は、松果体のUV光受容の特徴と神経節細胞への神経連絡を理解する上で、重要な組織学的特徴を持っている。具体的には、UV光受容細胞に対して、細胞内への色素注入で可視化し、その形態を詳細に観察すると、色素注入細胞を中心に、周辺のい

図3 ヤツメウナギ松果体のパラピノプシンを含むUV光受容細胞 (A) UV光受容細胞の波長感受性(●)とパラピノプシンの吸収スペクトル(破線)の比較。細胞内記録法で得たUV光受容細胞の波長感受性を示す相対反応曲線(n=3)と、3-デヒドロレチナールで再構成したパラピノプシンの分光学的解析により得られた吸収スペクトルは、よく一致する。(B) ヤツメウナギ松果体におけるパラピノプシンの免疫組織化学的局在。パラピノプシンは松果体の背側に局在する。Bar = 100 μ m。

くつかの細胞も標識された(図4 A)^{13, 16)}。つまり、UV光受容細胞には、ギャップ結合を介した細胞間連絡が存在し、その細胞間連絡は、少なくとも250 μ m $\times$ 100 μ mの広範囲にわたる領域で形成されていることが明らかになった。つまり、松果体に到達するUV光情報は、光受容細胞の段階で平均化され、外界のUV光の強度として検出されるのかもしれない。

3) パラピノプシン発現細胞の神経節細胞への投射

ヤツメウナギ松果体の神経節細胞は、多くが腹側から周縁部にかけての領域に局在しており、パラピノプシン発現細胞の多くが局在する松果体の背側領域にはほとんど存在しない(図4 B)。つまり、両者の位置関係だけからは、パラピノプシンを含むUV光受容細胞が、神経節細胞と神経連絡できないように思われた。そこで、両者の関係を組織的に解析したところ、パラピノプシンを含む光受容細胞からの神経突起が、松果体の周縁部に位置する神経節細胞に直接神経投射している様子が観察された¹³⁾。これまでの

図4 ヤツメウナギ松果体におけるUV光受容細胞と神経節細胞の組織学的特徴 (A) UV光受容細胞の細胞内染色像。光受容細胞間での色素の移動が見られる(細胞間連絡)。Bar = 30 μm。(B) 神経トレーサーによる松果体神経節細胞の逆行性標識像。神経節細胞は松果体の腹側に多く局在する(矢尻)。Bar = 50 μm。(C) UV光受容細胞と神経節細胞の関係。

電気生理学的解析から、多くの波長識別応答する神経節細胞は、松果体の周縁部に局在すると報告されている⁴⁵⁾。すなわち、ヤツメウナギ松果体において、パラピノプシンを含むUV光受容細胞は、ギャップ結合を介して広い受容野を形成し、キャッチしたUV光情報を、松果体周縁部で波長識別応答する神経節細胞に直接情報伝達することが示唆された(図4C)。

3-3. ヤツメウナギ松果体の波長識別における可視光受容

ヤツメウナギ松果体の波長識別において、どのように可視光が受容され、どのように情報伝達されるのかは大変興味深い。波長識別する神経節細胞は、UV光で抑制性、可視光で興奮性の光応答を示す。上述のように、UV光受容細胞は、測定光の全ての波長の光照射で過分極性応答を示し、UV光情報は波長識別する神経節細胞に直接伝達される。これらを考え合わせると、UV光受容細胞は、光照射に伴う過分極性応答により、グルタミン酸のような興奮性の神経伝達物質の放出を光依存的に抑制し、神経節細胞の抑制性の細胞応答を生み出すことが示唆された。つまり、UV光受容細胞は、網膜の光受容細胞の細胞応答やシグナル伝達と同様のメカニズムにより制御されると考えられた。一方で、松果体の波長識別応答において、興奮性応答に関わる光受容細胞が、光刺激に対してどのような光反応を示すのか、また、介在ニューロンの有無などを含め、どのよ

うに神経節細胞と神経連絡するのかは、未だ明らかになっていない。これまでの電気生理学的解析によると、波長識別の興奮性光応答の最大感度は~540 nmと報告されている⁴⁵⁾。これは、前述したヤツメウナギロドプシンの吸収極大とは一致しないことから、興奮性応答には、ヤツメウナギロドプシン以外のオプシンが関与する可能性が考えられる。

3-4. 松果体関連器官における波長識別応答

前述したように、円口類・魚類における副松果体や、両生類カエルの前頭器官、爬虫類トカゲの頭頂眼のように、下等脊椎動物の中には松果体と非常に類似した器官(松果体関連器官)を松果体の近傍にもつものが知られている。円口類ヤツメウナギの副松果体は、パラピノプシンやロドプシンを含む複数種類の光受容細胞や¹⁶⁾、神経節細胞が存在するなど、非常に発達した形態的特徴を有しているが、これらの光受容細胞や神経節細胞からの電気生理学的な光応答に関する報告はなされていない。

一方で、爬虫類トカゲは、副松果体から進化したとされる頭頂眼と呼ばれる松果体関連器官を持つ。頭頂眼は、眼と同様にレンズと網膜で構成されるが、その中に、非常にユニークな光反応を示す光受容細胞が存在することが報告されている。具体的には、頭頂眼の光受容細胞の電気生理学的解析がなされ、1つの光受容細胞が青色光の照射により過分極し、緑色光照射により脱分極することが見出された^{36, 37)}。この光応答は、照射する光の波長によりその応答性を変化させることから、上述の波長識別応答の一種であると結論された。脊椎動物においては、眼の視細胞や松果体光受容細胞は、光照射で一過性の過分極応答を示すと報告されており、このような波長依存性の拮抗的な光応答は非常に特徴的である。ユタトカゲ(*Uta stansburiana*)の頭頂眼において、単一の光受容細胞に、青色光感受性のピノプシンと緑色光感受性のパリエトプシンと呼ばれる2種類の非視覚オプシンが共局在し、二次メッセンジャーであるcGMPの濃度を拮抗的に変化させることで、このような光応答を生み出すという新規のメカニズムが報告されている³⁷⁾。興味深いことに、著者らは、UV光と可視光を検出できるとの報告がある爬虫類イグアナの頭頂眼では、1つの光受容細胞に、ピノプシンの代わりにパラピノプシンがパリエトプシンと共局在していることを見出した⁴⁷⁾。これは、単一の光受容細胞における波長識別でも、UV光受容タンパク質としてパラピノプシンが機能することを強く示唆している。また、パリエトプシンと共に働く光受容タンパク質が、2種類のトカゲの間で多様化していることも大変興味深い。

両生類カエルは、松果体の前方部から分化した前頭器官と呼ばれる松果体関連器官を持つ。前頭器官においては、波長識別応答と明暗応答に関わる神経節細胞からの電気生理応答が記録されている⁵⁾。アカガエル(*Rana temporaria*)の前頭器官の波長識別応答では、抑制性応答が355 nmのUV光領域に、興奮性応答が515 nmの可視光領域に、それぞれ最大感度を示すと報告されている。パラピノプシンは、ツメガエル(*Xenopus tropicalis*)の前頭器官を含む組織から単離されているので¹⁶⁾、両生類の前頭器官においても抑制性光応答のUV光受容を担う可能性が考えられる。つまり、著者らは、パラピノプシンは松果体やその関連器官の波長識別におけるUV光受容の共通の分子基盤であると考

えている。

4. 松果体とその関連器官で発現するロドプシン類の分子進化

これまでに、2000種類以上のロドプシン類が同定され、それらは分子系統樹上で、少なくとも8つのサブグループに分類される^{42, 43)}。ピノプシンの発見以来²⁹⁾、様々な非視覚オプシンが同定されてきた。松果体やその関連器官においては、網膜の桿体視細胞、錐体視細胞で機能する視覚オプシンに加えて、ピノプシン²⁹⁾、パラピノプシン³⁾、エクソロドプシン²¹⁾、VAオプシン³²⁾、メラノプシン¹⁾、パリエトプシン³⁷⁾といった非視覚オプシンなど、多様なロドプシン類が発現することが報告されている。また、エクソロドプシン、ピノプシン、VAオプシン、パラピノプシン、パリエトプシンは、脊椎動物の視覚オプシンと非常に近縁であり、これらが脊椎動物の視物質の進化を考える上で重要であると考えられる。

先行研究において、節足動物や軟体動物の視物質 (Gq 型 G タンパク質と共役する視覚オプシン) と同様に、Opn3 (エンセファロプシン)、Opn4 (メラノプシン)、Opn5 (ニューロプシン) などの非視覚オプシンは、光照射により生成する G タンパク質を活性化する光産物は安定であり、次の光照射で元の暗状態に戻ることを示された^{14, 17-19, 23, 48)}。暗状態と光産物の2状態が安定であり、このような性質をもつロドプシン類は bistable pigment と呼ばれる (図5)^{42, 43)}。以降、本稿ではこれらを bistable ロドプシン類と表記する。一方で、脊椎動物の視物質 (視覚オプシン) は、光産物が不安定であり、発色団レチナールを放出して、退色する (退色型ロドプシン類、図5)。松果体等で発現する脊椎動物の非視覚オプシンに関しては、詳細な分光学的解析から、ピノプシンとエクソロドプシンは退色型であるが、光産物 (メタ II 中間体) の崩壊速度が桿体型と錐体型の間であり、中間的な性質を有している^{27, 41)}。パリエトプシンと VA オプシンもまた退色型であると報告されている^{33, 34)}。しかしながら、上述したように、パラピノプシンは、脊椎動物の視覚オプシンと相溶性の高いアミノ酸配列を有するが、無脊

椎動物の視覚オプシンと同様に、bistable ロドプシン類の性質を有していた¹⁶⁾。

ロドプシン類においては、可視光を受容するために重要である対イオン (カウンターイオン) を、どの位置のアミノ酸残基が担うのかは、光産物の分子特性と密接な関係にあることが示唆されている。対イオンを担うアミノ酸残基に着目した変異体解析から、パラピノプシンでは、脊椎動物の視覚オプシンと相溶性の高いアミノ酸配列を有しているにも関わらず、無脊椎動物の視覚オプシンと同じ位置にあるアミノ酸残基が、対イオンとして機能していることが示された⁴⁴⁾。つまり、パラピノプシンは、脊椎動物の視覚オプシンと無脊椎動物の視覚オプシンの間の中間的な性質を有しており、退色型を示す脊椎動物の視覚オプシンは、パラピノプシンに似た分子特性を持つ祖先型の bistable ロドプシン類から進化したことが示唆された。

光受容タンパク質と情報伝達分子の間の進化的関連性

脊椎動物網膜の視細胞では、光を受容して活性化した光受容タンパク質 (視覚オプシン) が、G タンパク質トランスデューシンを活性化することで光応答し、シグナル伝達の遮断に関わるアレスチンと相互作用することで、光反応が停止される⁴⁹⁾。上述したように、パラピノプシンと脊椎動物の視覚オプシンとでは、G タンパク質を活性化する光産物の分子特性が異なっており、そのために、パラピノプシンによって駆動されるシグナル伝達系が、脊椎動物の視覚オプシンによるものとは異なる可能性が考えられた。そこで、パラピノプシンが駆動する情報伝達システム、すなわち相互作用する G タンパク質とアレスチンについて解析した。

著者らの免疫組織化学的解析から、パラピノプシンはトランスデューシンという脊椎動物の視覚系に特有な G タンパク質と共役することが示唆された¹¹⁾。一方で、アレスチンについては、遺伝子クローニング、免疫組織化学、生化学的な実験を組み合わせた解析の結果、パラピノプシンは、視物質と共役する「視覚アレスチン」ではなく、ホルモンや神経伝達物質の受容体と共役する「 β アレスチン」と共役することを見出した¹¹⁾。具体的には、パラピノプシン発現細胞において、 β アレスチンの光依存的な細胞内移動が見られたことから、 β アレスチンが、視覚アレスチンと同様に、光により活性化されたパラピノプシンと結合して、G タンパク質を介したシグナル伝達系を遮断することが示唆された。これは、 β アレスチンが光受容系で用いられる初の例として注目される。

哺乳類における様々な G タンパク質共役型受容体 (GPCR) が関わる情報伝達系において、 β アレスチンは主に2つの機能に関わることが知られている^{9, 20)}。1つは、活性化した受容体と結合して、G タンパク質を介したシグナル伝達系を遮断することで、もう1つは、クラスリン介在性の内部移行 (internalization) を誘導することである。内部移行とは、 β アレスチンを介したエンドサイトーシスにより、細胞膜表面から活性化受容体を取り除くことで、細胞の脱感作を担う。後者の機能に関連して、 β アレスチンはクラスリン結合ドメインを有しており、視覚アレスチンはそれを持たない。そこで、パラピノプシンを含む松果体光受容細胞において、パラピノプシンと β アレスチンの相互作用に関して免疫組織化学的に解析したところ、興味深いことに、光照射条件下で、パラピノプシンを含む細胞内顆粒が多数

図5 ロドプシン類の分子特性 光受容タンパク質は、退色型ロドプシン類と bistable 型ロドプシン類に区別される。文献¹²⁾より改変。

観察された。さらに、その細胞内顆粒には、 β アレスチンは共局在したが、Gタンパク質は含まれていなかった。また、培養細胞系を用いた検証実験において、哺乳類の β アレスチンの系と同様に、ヤツメウナギ β アレスチンが、パラピノプシンのクラスリンを介した内部移行を光依存的に誘導することが示唆された。すなわち、松果体光受容細胞で観察された細胞内顆粒は、光受容部位である外節からパラピノプシンを除去するために、 β アレスチンを介した内部移行によって生成することが示唆された。

β アレスチンを介した内部移行による光活性化型パラピノプシンの除去は、活性化状態にあるパラピノプシンを含む細胞を暗状態に戻すメカニズムに関わるのかもしれない。脊椎動物の視細胞において、ロドプシンの光産物は不安定であり、光産物からall-trans型レチナルを放出して退色(自己分解)することで、徐々に元の暗状態へと戻ることができる。しかしながら、パラピノプシンの光産物は安定であり、レチナルを放出せず、退色しない。そこで、Gタンパク質を活性化し続ける非退色型の光産物を取り除くために、光産物の内部移行を誘導することができる β アレスチンと結合して、細胞を元の暗状態へと回復させるのかもしれない。ショウジョウバエの視細胞においても、視物質(無脊椎動物型視覚オプシン)は安定な光産物へと変換されるが、視物質は無脊椎動物型アレスチンと結合して、シグナル伝達を遮断し⁷⁾、光依存的に視物質を内部移行することが知られている³⁵⁾。興味深いことに、無脊椎動物型アレスチンはクラスリン結合ドメインを持たないが、AP-2と呼ばれるアダプタータンパク質との相互作用を介して、視物質の光依存的なクラスリン介在性の内部移行を行っている³¹⁾。つまり、bistableロドプシン類におけるアレスチンを介した内部移行は、光受容細胞を元の暗状態へと戻すために、シグナル伝達系から活性化した受容体を完全に取り除くための一般的な戦略であるのかもしれない。

脊椎動物の視覚アレスチンは、ヤツメウナギを含む様々な脊椎動物で広く発見されており、網膜視細胞に加えて、退色型ロドプシン類を含む松果体光受容細胞に局在している。言い換えると、ほとんどの視覚アレスチンは、退色型ロドプシン類と共役して機能している。興味深いことに、脊椎動物と近縁な無脊椎動物のホヤでは、光受容タンパク質は、脊椎動物の β アレスチンとよく似た機能を持つアレスチンと結合する²⁶⁾。つまり、脊椎動物の視覚アレスチンは、祖先型の β 様アレスチンから多様化したと考えられた。脊椎動物の視細胞では、視物質の光産物が退色するため、光産物の特異的な内部移行は必要ないので、視覚アレスチンは、内部移行を仲介する分子機能(クラスリン結合ドメイン)が失われたと考えられた。すなわち、これらの発見は、オプシンの進化・多様化が情報伝達分子と進化的に関係していることを示唆しており、脊椎動物の視細胞における特徴的な光情報伝達系の獲得を促進することとなったと推測された(図6)¹²⁾。

5. まとめと考察

下等脊椎動物の松果体において、波長識別応答のUV光受容を担う非視覚オプシンとして、パラピノプシンを同定した。パラピノプシンは、脊椎動物の視覚オプシンと相同性の高いアミノ酸配列を有するが、無脊椎動物の視覚オプ

図6 光受容タンパク質とアレスチンの分子進化の相関関係 光受容タンパク質(左)とアレスチン(右)の系統関係を示す。 β アレスチンとCi-arrestinは、クラスリン結合ドメイン(黒丸)を持つ。系統樹間の矢印は、光受容タンパク質とアレスチンの相互関係を示す。文献¹²⁾より改変。

シンと同様に、bistableロドプシン類の性質を持っている。脊椎動物の視覚の光受容システムは、無脊椎動物や非視覚のものと比較すると、視覚オプシンが効率よくGタンパク質トランスデューシンを活性化するなど、光受容に特化しているが、その進化を考える際に、構造と性質の面で中間的な位置づけであるパラピノプシンはカギとなると考えられ、注目される。

また、パラピノプシンが有するbistableロドプシン類としての性質は、松果体の光受容に適していることが示唆された。退色型ロドプシン類を用いる系では、暗状態のロドプシン量が減ることや、退色後のオプシンが細胞内に存在することが、細胞の明順応に寄与すると考えられる。光受容細胞の明順応は、眼の色覚において重要な役割を果たしている。つまり、環境光の波長成分が異なり、対象物からの反射光の分光特性が変化しても、色覚を担う視細胞がそれぞれ明順応することで、対象物をほとんど同じ色として認識できるとされている(色の恒常性)。たとえば、太陽光下でも蛍光灯下でも、赤いリンゴは同じ色に見える。このメカニズムでは、相対的な色のバランスを見ることが出来る。これに対してパラピノプシンを用いた系では、暗状態のパラピノプシン量が大きく減らず、退色しないので、光受容タンパク質レベルでの明順応はできないと考えられる。そこで、パラピノプシンを含む光受容細胞は、光に対する感度を一定に保つこととなり、環境光の波長成分をそのまま検出する。つまり、絶対的な基準で波長バランスの変化を捉えることができ、松果体の波長識別に適したメカニズムであると考えられる。

非視覚系における波長識別は、円口類から爬虫類までの様々な下等脊椎動物が持つ重要な機能である。しかし、その生理機能については、夜明けや夕暮れ時の環境光の波長成分の変化をモニターするなど、様々な推測がなされているものの、詳細は未だ不明である。動物が、視覚だけでなく、非視覚で受容した色情報(波長情報)をどのような機能に利用しているかは大変興味深く、これらの生物学的意義を理解することが、今後の課題である。

謝 辞

本研究を行う上で、大阪市立大学の寺北明久先生には、多大なるご指導を頂きました。また、本研究の共同研究者である大石正先生（奈良女子大学）、小柳光正先生（大阪市立大学）、七田芳則先生（京都大学）、保智己先生（奈良女子大学）、古谷（衣川）嘉氏（奈良女子大学）、和田清二博士（奈良女子大学）に、深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Bailey, M.J. & Cassone, V.M.: Brain Res. Mol. Brain Res., 134, 345-348 (2005)
- 2) Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E., Thomas, T.L. & Zoran, M.J.: Nat. Rev. Genet., 6, 544-556 (2005)
- 3) Blackshaw, S. & Snyder, S.H.: J. Neurosci., 17, 8083-8092 (1997)
- 4) Dodt, E.: Handbook of sensory physiology, pp. 113-140, Springer (1973)
- 5) Dodt, E. & Heerd, E.: J. Neurophysiol., 25, 405-429. (1962)
- 6) Dodt, E. & Meissl, H.: Experientia, 38, 996-1000 (1982)
- 7) Dolph, P.J., Ranganathan, R., Colley, N.J., Hardy, R.W., Socolich, M. & Zuker, C.S.: Science, 260, 1910-1916 (1993)
- 8) Falcon, J., Marmillon, J.B., Claustrat, B. & Collin, J.P.: J. Neurosci., 9, 1943-1950 (1989)
- 9) Goodman, O.B., Jr., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H. & Benovic, J.L.: Nature, 383, 447-450 (1996)
- 10) Kappers, J.A.: Prog. Brain Res., 10, 87-153 (1965)
- 11) Kawano-Yamashita, E., Koyanagi, M., Shichida, Y., Oishi, T., Tamotsu, S. & Terakita, A.: PLoS ONE, 6, e16402 (2011)
- 12) Kawano-Yamashita, E., Koyanagi, M. & Terakita, A.: in Hunt, D.M., Hankins, M.W., Collin, S.P. & Marshall, N.J. (eds.) Evolution of visual and non-visual pigments, pp. 1-21, Springer (2014)
- 13) Kawano-Yamashita, E., Terakita, A., Koyanagi, M., Shichida, Y., Oishi, T. & Tamotsu, S.: J. Exp. Biol., 210, 3821-3829 (2007)
- 14) Kojima, D., Mori, S., Torii, M., Wada, A., Morishita, R. & Fukada, Y.: PLoS ONE, 6, e26388 (2011)
- 15) Korf, H.W., Foster, R.G., Ekstrom, P. & Schalken, J.J.: Cell Tissue Res., 242, 645-648 (1985)
- 16) Koyanagi, M., Kawano, E., Kinugawa, Y., Oishi, T., Shichida, Y., Tamotsu, S. & Terakita, A.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101, 6687-6691 (2004)
- 17) Koyanagi, M., Kubokawa, K., Tsukamoto, H., Shichida, Y. & Terakita, A.: Curr. Biol., 15, 1065-1069 (2005)
- 18) Koyanagi, M., Takada, E., Nagata, T., Tsukamoto, H. & Terakita, A.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 110, 4998-5003 (2013)
- 19) Koyanagi, M. & Terakita, A.: Photochem. Photobiol., 84, 1024-1030 (2008)
- 20) Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J.: Science, 248, 1547-1550 (1990)
- 21) Mano, H., Kojima, D. & Fukada, Y.: Brain Res. Mol. Brain Res., 73, 110-118 (1999)
- 22) Masuda, H., Oishi, T., Ohtani, M., Michinomae, M., Fukada, Y., Shichida, Y. & Yoshizawa, T.: Tissue Cell, 26, 101-113 (1994)
- 23) Matsuyama, T., Yamashita, T., Imamoto, Y. & Shichida, Y.: Biochemistry, 51, 5454-5462 (2012)
- 24) Morita, Y.: Experientia, 25, 1277 (1969)
- 25) Morita, Y., Samejima, M. & Tamotsu, S.: Arch. Histol. Cytol., 52 Suppl., 469-475 (1989)
- 26) Nakagawa, M., Orii, H., Yoshida, N., Jojima, E., Horie, T., Yoshida, R., Haga, T. & Tsuda, M.: Eur. J. Biochem., 269, 5112-5118 (2002)
- 27) Nakamura, A., Kojima, D., Okano, T., Imai, H., Terakita, A., Shichida, Y. & Fukada, Y.: J. Biochem., 129, 329-334 (2001)
- 28) Okano, T. & Fukada, Y.: J. Pineal Res., 22, 145-151 (1997)
- 29) Okano, T., Yoshizawa, T. & Fukada, Y.: Nature, 372, 94-97 (1994)
- 30) Oksche, A.: Prog. Brain Res., 10, 3-29 (1965)
- 31) Orem, N.R., Xia, L. & Dolph, P.J.: J. Cell. Sci., 119, 3141-3148 (2006)
- 32) Philp, A.R., Garcia-Fernandez, J.M., Soni, B.G., Lucas, R.J., Bellingham, J. & Foster, R.G.: J. Exp. Biol., 203, 1925-1936 (2000)
- 33) Sakai, K., Imamoto, Y., Su, C.Y., Tsukamoto, H., Yamashita, T., Terakita, A., Yau, K.W. & Shichida, Y.: Biochemistry, 51, 1933-1941 (2012)
- 34) Sato, K., Yamashita, T., Ohuchi, H. & Shichida, Y.: Biochemistry, 50, 10484-10490 (2011)
- 35) Satoh, A.K. & Ready, D.F.: Curr. Biol., 15, 1722-1733 (2005)
- 36) Solessio, E. & Engbretson, G.A.: Nature, 364, 442-445 (1993)
- 37) Su, C.Y., Luo, D.G., Terakita, A., Shichida, Y., Liao, H.W., Kazmi, M.A., Sakmar, T.P. & Yau, K.W.: Science, 311, 1617-1621 (2006)
- 38) Tamotsu, S., Korf, H.W., Morita, Y. & Oksche, A.: Cell Tissue Res., 262, 205-216 (1990)
- 39) Tamotsu, S. & Morita, Y.: Comp. Biochem. Physiol., 96B, 487-490 (1990)
- 40) Tamotsu, S., Oishi, T., Nakao, K., Fukada, Y., Shichida, Y., Yoshizawa, T. & Morita, Y.: Cell Tissue Res., 278, 1-10 (1994)
- 41) Tarttelin, E.E., Fransen, M.P., Edwards, P.C., Hankins, M.W., Schertler, G.F., Vogel, R., Lucas, R.J. & Bellingham, J.: Cell Mol. Life Sci., 68, 3713-3723 (2011)
- 42) Terakita, A.: Genome Biol., 6, 213 (2005)
- 43) Terakita, A., Kawano-Yamashita, E. & Koyanagi, M.: WIREs Membr. Transp. Signal, 1, 104-111 (2012)
- 44) Terakita, A., Koyanagi, M., Tsukamoto, H., Yamashita, T., Miyata, T. & Shichida, Y.: Nat. Struct. Mol. Biol., 11, 284-289 (2004)
- 45) Uchida, K. & Morita, Y.: Pflügers Arch., 427, 373-377 (1994)
- 46) Uchida, K., Nakamura, T. & Morita, Y.: Neuroscience, 47, 241-247 (1992)

- 47) Wada, S., Kawano-Yamashita, E., Koyanagi, M. & Terakita, A.: PLoS ONE, 7, e39003 (2012)
- 48) Yamashita, T., Ohuchi, H., Tomonari, S., Ikeda, K., Sakai, K. & Shichida, Y.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 107, 22084-22089 (2010)
- 49) Yau, K.W. & Hardie, R.C.: Cell, 139, 246-264 (2009)

Abstract

Physiological and evolutionary implications of the molecular basis for wavelength-discrimination in pineal and related organs

Emi KAWANO-YAMASHITA

Department of Biology and Geosciences, Graduate School of Science, Osaka City University, 3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585, Japan.

The pineal and related organs in non-mammalian vertebrates sense light directly. The light information they receive is involved in the regulation of various non-visual functions, including regulation of circadian rhythm. The pineal and related organs of lower vertebrates are not only capable of irradiance detection but also of wavelength discrimination – determining the ratio of UV light to visible light. We have shown spectroscopically, histochemically and electrophysiologically that parapinopsin serves as a UV-sensitive pigment underlying the wavelength discrimination in the lamprey pineal. Interestingly, parapinopsin has molecular characteristics of both vertebrate and invertebrate opsin-based pigments. We further found that in the lamprey pineal photoreceptor cells, parapinopsin was not colocalized with visual arrestin, but instead colocalized with and coupled to beta-arrestin, which generally binds to stimulated G protein-coupled receptors (GPCRs) other than opsin-based pigments. These results support the idea that parapinopsin may represent an evolutionary intermediate between non-visual and visual pigments. I therefore propose that parapinopsin is a key opsin-based pigment not only for uncovering the mechanism and function of pineal wavelength discrimination but also for understanding the evolution of visual pigments and phototransduction proteins.

Keywords: rhodopsin, arrestin, pineal, wavelength discrimination, photoreceptor cell