

論文内容の要旨

論文題目 A Study of the Spectral Tuning and the Cell Type Specific Expressional Regulation of Zebrafish Visual Pigments for Elucidation of the Evolution of Color Vision

(ゼブラフィッシュを用いた視物質吸収光特性の進化変遷及び視物質遺伝子の発現制御領域の探索による色覚進化の研究)

氏名 知念 秋人

序論

視物質は七回膜貫通型蛋白質であるオプシンと発色団であるレチナールから構成される光受容分子であり、特定の波長範囲の光を吸収した時に光情報を細胞内へ伝達する。脊椎動物の視物質は進化系統関係に基づき5つのグループに分類される。桿体型のRH1、紫外から青色の光を吸収するSWS1、青色の光を吸収するSWS2、緑色の光を吸収するRH2、緑色から赤色の光を吸収するM/LWSである。遺伝子重複や欠失によるオプシン遺伝子の数の変化と、オプシンのアミノ酸置換に伴う視物質の吸収光波長の変化による視物質レパートリーの進化変遷は、動物の生息する光環境への適応と密接に関係することがこれまでに明らかにされてきた。

動物が色覚を獲得するためには少なくとも、異なる吸収波長を有する複数の視物質遺伝子を獲得すること、及び異なる視物質をそれぞれ特異的な光受容細胞で発現することが必要である。私はゼブラフィッシュを用いこれら2つの条件に焦点をあて、色覚システムを獲得してきた進化の過程を理解したいと考えた。魚類には5つのグループ全ての視物質を有する種が多く、その魚類のなかでもゼブラフィッシュは発生学・遺伝学において優れたモデル動物であり遺伝子発現制御機構を研究する上で様々な知見や実験手法を利用できるからである。

ゼブラフィッシュは1種類の桿体細胞と形態的に区別できる4種類の錐体細胞を有する。1999年 Vihtelic らは各1種類のRH1、SWS1、SWS2、LWS、と2種類のRH2のcDNAを単離し、それぞれが桿体細胞、短形単錐体細胞、長形単錐体細胞、長形複錐体細胞、短形複錐体細胞で発現していることを明らかにした。そこで、私の所属する研究室は、ゼブラフィッシュ視物質遺伝子の

発現制御領域を探索するために、それら視物質遺伝子を含むゲノム領域を単離した(図1)。この中にはcDNAでは単離されていなかった、新規の遺伝子3種類(LWS-2とRH2-2及びRH2-3)が含まれていた。またSWS2と2種類のLWSが直列に並んでおり、4種類のRH2も別に4重複構造をしていることが明らかになった。

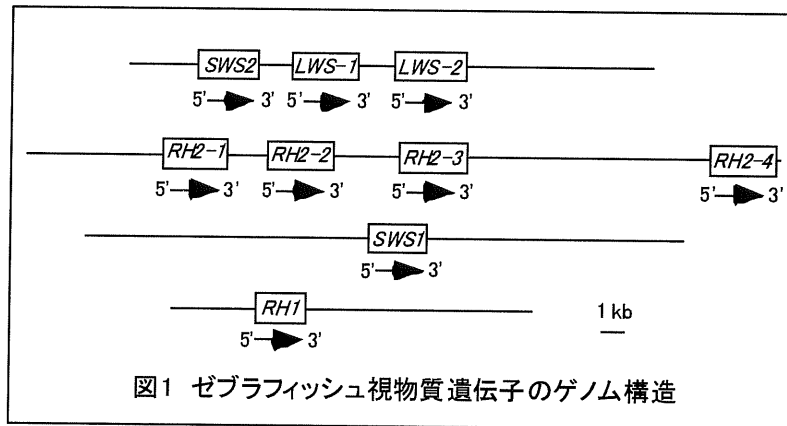


図1 ゼブラフィッシュ視物質遺伝子のゲノム構造

ゼブラフィッシュのゲノム中にはこれら9種類以外の視物質遺伝子が存在しないことがゲノムサザンハイブリダイゼーション及びゲノムデータベースにより確認された。これらの知見を踏まえ私は以下のことを行った。

1. 9種類のゼブラフィッシュ視物質の吸収光特性と眼球における相対的発現量

ゼブラフィッシュの9種類の視物質を培養細胞を用い生合成し、その吸収波長を測定した(図2)。その結果、4種類のRH2及び2種類のLWSの吸収波長が互い異なることを明らかにした。それらの最大吸収波長(λ_{max})は次の通りであった、RH2-1: 467 nm, RH2-2: 476 nm, RH2-3: 488 nm, RH2-4: 505 nm, LWS-1: 558 nm, LWS-2: 548 nm。また、RH1、SWS1、SWS2の λ_{max} はそれぞれ501、355、416 nmであった。

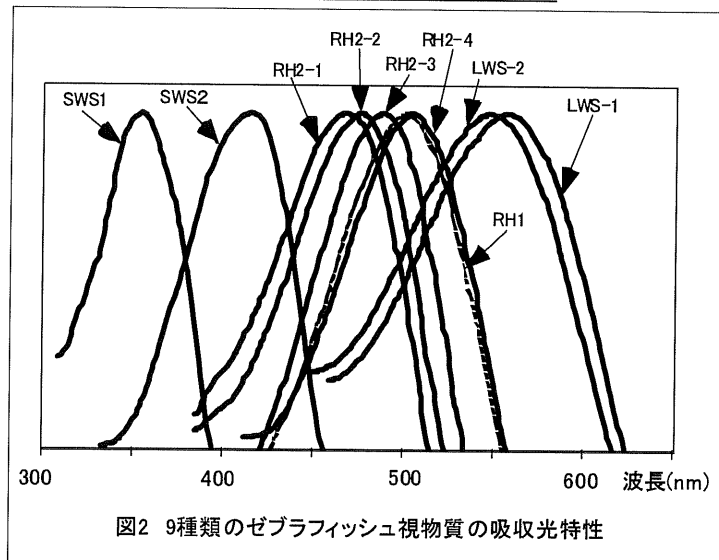


図2 9種類のゼブラフィッシュ視物質の吸収光特性

ゼブラフィッシュの各視物質遺伝子の眼球における発現量の相対値をリアルタイム RT-PCRにより定量した(図3)。その結果、SWS2とRH2-2の発現が他の錐体型視物質遺伝子の発現量に比べきわめて多く、ついでSWS1の発現量が多かった。2種類のLWSの発現量はきわめて低く、これらの間ではLWS-2の発現量がLWS-1の発現量に比べ低かった。RH2-1とRH2-3及びRH2-4はきわめて低いレベルではあるが発現していた。電気生理学的な方法によりゼブラフィ

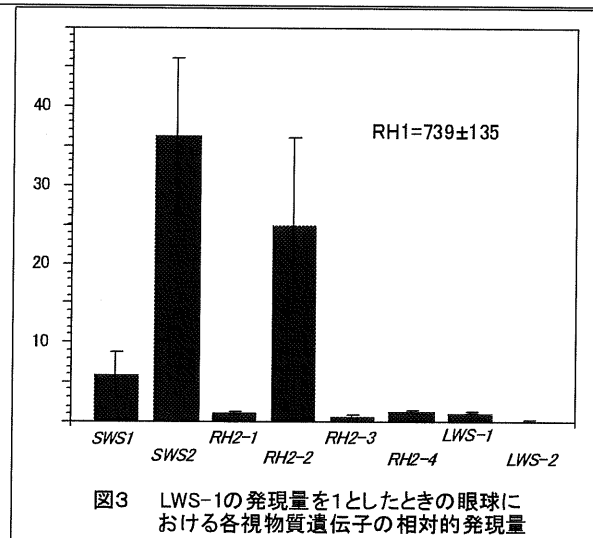


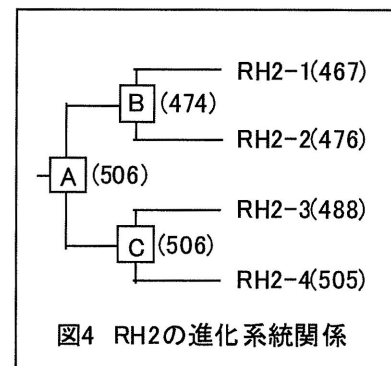
図3 LWS-1の発現量を1としたときの眼球における各視物質遺伝子の相対的発現量

シユ網膜の光感受性は短波長側で高く長波長側で低いということが報告されており、私の結果はこの傾向が視物質の発現量の差によりもたらされることを示していた。

2. ゼブラフィッシュ RH2 及び SWS2 視物質の吸収光波長の進化変遷

視物質の吸収波長の変化に影響をおよぼすアミノ酸座位は RH1, SWS1, M/LWS 視物質グループに関して詳しく調べられている。しかし、RH2 と SWS2 視物質グループに関してはまだ良く理解されていない。これまでに報告されている脊椎動物 RH2 の λ_{max} はおよそ 470-510 nm の範囲にある。ゼブラフィッシュの 4 種類の RH2 の λ_{max} (467-505 nm) はほぼその範囲を含んでおり、脊椎動物 RH2 の吸収波長の変化に影響をおよぼすアミノ酸座位を探索する上でよい材料になると考えた。また、ゼブラフィッシュ SWS2 の吸収波長は他の脊椎動物の SWS2 に比べ大きく短波長にシフトしているが、その原因となるアミノ酸座位は分かっていない。そこで、ゼブラフィッシュ RH2 及び SWS2 視物質の吸収波長の進化変遷を次のように検討した。

脊椎動物 RH2 の塩基配列から系統樹を作成した結果、ゼブラフィッシュの 4 種類の RH2 の系統関係は図 4 で示すトポロジーをとることを高いブートストラップ値で明らかにした。この系統関係を基にそれぞれの分岐点における祖先型のアミノ酸配列を最尤法により推定した。祖先型視物質を複数の点変異を導入することにより作成し、その吸収波長を測定した。4 種類の RH2 共通の祖先型視物質(A)と RH2-3 と RH2-4 の共通の祖先型視物質(C)の λ_{max} は 506 nm で RH2-4 とほぼ同じ値を示した。RH2-1



と RH2-2 の共通の祖先型視物質(B)の λ_{max} は 474 nm であった。続いて、A から B 及び C から RH2-3 への枝でそれぞれ独立に、122 番目のアミノ酸がグルタミン酸からグルタミンに変化し、 λ_{max} がそれぞれ 15 nm, 14 nm 短波長シフトしたことを点変異導入視物質により明らかにした。さらに、A から B 及び B から RH2-1 への枝で複数のアミノ酸置換が λ_{max} の短波長シフトに影響をおよぼしていることを明らかにした。

SWS2 に関してはゼブラフィッシュと近縁である金魚の SWS2 (λ_{max} : 443 nm)と比較することで短波長シフトの原因となるアミノ酸置換を探索した。ゼブラフィッシュと金魚の祖先型視物質は 430 nm の λ_{max} を有し、ゼブラフィッシュへの枝で短波長シフトが、また金魚への枝で長波長シフトが生じていることを明らかにした。それぞれの枝で λ_{max} のシフトに効果のあるアミノ酸置換を複数同定した。

3. RH2 視物質遺伝子の発現制御領域の探索

RH2-1 遺伝子の発現制御領域を探索するため、RH2-1 の 5'上流 7.3 kb と GFP レポーター遺伝子を結合させたコンストラクト及び 5'上流 1.5 kb と GFP を結合させたコンストラクトをそれぞれゼブラフィッシュ胚へ導入したが、眼球での GFP の発現を確認できなかった。DNA 領域が不十分と考え、新たに 4 種類の RH2 遺伝子を含む約 85 kb のインサート DNA を有する PAC クローンを

単離し解析を進めていくことにした。RH2-1 の 5' 上流 1.5 kb と GFP を結合させたコンストラクトと PAC クローン制限酵素断片を混合し、ゼブラフィッシュ胚へ共導入した。その結果、最終的に RH2-1 上流約 15 kb に存在する 0.5 kb の制限酵素断片を加えた時に GFP が眼球で発現することを明らかにした。この 0.5 kb 領域に既知の転写制御モチーフ配列は見出せなかった。0.5 kb 領域と RH2-1 の 5' 上流 1.5 kb 及び GFP を結合させたコンストラクトを用いてトランスジェニックゼブラフィッシュ (TGZF) を作成した。この TGZF は網膜中心部の複錐体細胞で GFP を発現しており、所属研究室で得られている *in situ hybridization* の結果と整合していた。

RH2-2 の 5' 上流 3 kb と GFP を結合させたコンストラクトを用いた TGZF は複錐体細胞では GFP を発現せず、ごく一部の双極細胞で発現していた。そこで RH2-1 の発現に関与していた 0.5 kb 断片と RH2-2 の 5' 上流 3 kb 及び GFP を結合させたコンストラクトを用いて TGZF を作成した。この TGZF は網膜中心から背側領域にかけての複錐体細胞で GFP を発現しており、*in situ hybridization* の結果と整合していた (図 5)。

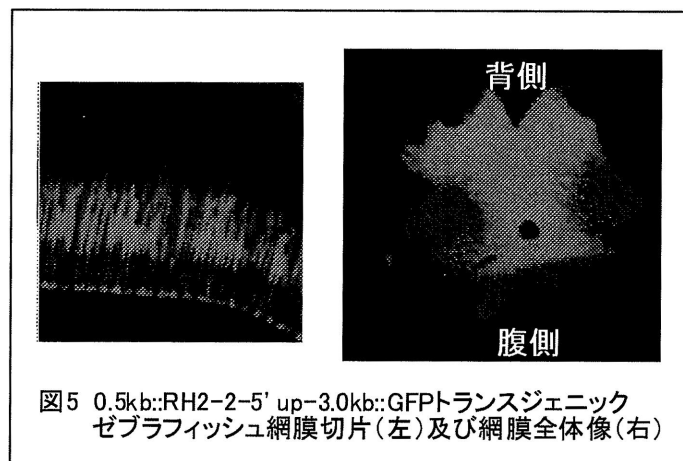


図5 0.5kb::RH2-2-5' up-3.0kb::GFPトランスジェニックゼブラフィッシュ網膜切片(左)及び網膜全体像(右)

これらの結果は RH2-1 上流約 15 kb に存在する 0.5 kb の領域が RH2-1 及び RH2-2 の発現に共に必要であることを示している。RH2-3 及び RH2-4 に関しては *in situ hybridization* の結果と整合するような GFP の発現を誘導する DNA 領域をまだ同定できておらず、更なる解析が必要である。

結論

動物が色覚を獲得するためには、異なる吸収波長を有する視物質遺伝子の獲得及び、細胞種特異的な視物質遺伝子の発現制御機構の獲得が少なくとも必要である。私はゼブラフィッシュを用い、RH2 と SWS2 視物質の吸収波長変化の分子メカニズム、及び RH2 視物質の発現制御機構に関して以下の点を明らかにした。1) 9 種類のゼブラフィッシュ視物質は異なる吸収光特性を有し、眼球において発現量が異なる。2) ゼブラフィッシュ RH2 と SWS2 視物質の吸収波長の変化に効果をおよぼす複数のアミノ酸置換を同定した。3) 複錐体細胞特異的な RH2-1 及び RH2-2 の発現を誘導する発現調節領域を RH2-1 遺伝子上流 15kb に存在する 0.5kb 領域に見出した。

発表論文

1) Akito Chinen, Taknori Hamaoka, Yukihiro Yamada, Shoji Kawamura, Gene duplication and spectral diversification of cone visual pigments of zebrafish, *Genetics*, 2003, 163: 663-675.