

論文内容の要旨

論文題目 **Gene duplication and spectral differentiation of visual opsins among closely related medaka (*Oryzias*) species as a model to understand diverse evolution of fish visual systems**

(メダカ属近縁種における視覚系オプシンの遺伝子重複と吸収光分化
:魚類視覚システムの多様化進化を理解するためのモデルとして)

氏名 **松本 圭史**

序論

視覚は眼球の網膜中に存在する光受容細胞である視細胞に、光が当たることにより開始する。視細胞は桿体細胞と錐体細胞の 2 種類がある。桿体細胞は薄暗闇で働き明暗の識別を担い、錐体細胞は色覚を担う。これら視細胞の外節膜中には光受容物質である視物質が多量に産生される。視物質は 7 回膜貫通タンパク質であるオプシンとレチナールの複合体である。視物質に特定の波長が吸収されると、レチナールの立体構造の変化が引き金となり、細胞内に光情報を伝達する。

脊椎動物の視物質は進化系統学的に 5 タイプに分類できる。桿体細胞で発現し明暗の識別を担う RH1(Rod opsin)と、残りの 4 タイプは錐体細胞で発現し色覚を担い、M/LWS (Middle to long wavelength-sensitive; 赤型)、RH2(Rod opsin like 2; 緑型)、SWS2(Short wavelength-sensitive type 2; 青型)、SWS1 (Short wavelength-sensitive type 1; 紫外線型)である。爬虫類、鳥類はこれら 5 つのタイプからそれぞれ 1 種類ずつの視物質遺伝子を持つのに対して、哺乳類は緑型と青型を失っていることが知られている。一方、魚類は 5 タイプ全ての視物質遺伝子を有しているだけでなく、それぞれのタイプのどれかで遺伝子重複を起こし複数のサブタイプを持つ種も存在する。従って、魚類は脊椎動物の中で最も高度な色覚系を有していると考えられる。しかしこれまで、ゲノム中の全視物質遺伝子が単離されたのは当研究室で明らかにしたゼブラフィッシュのみであり、魚類視物質遺伝子レパートリーの全貌やその意義は定かではなかった。そこで、私はゼブラフィッシュと系統学的に大きく離れたモデル生物であるニホンメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて、全視物質遺伝子を単離し、それらのゲノム構成、最大吸収波長 (λ_{max})、相対的発現量を明らかにすることにより、魚類視物質遺伝子の特徴をより深く理解したいと考えた。さらにそれらの結果から、魚類が多種類の視物質遺伝子を持つ意義について考察したいと考えた。

さらに、ニホンメダカを含むメダカ属の、ゼブラフィッシュに無い特徴として、近縁種が系統維持されていることが挙げられる。メダカ属はニホンメダカの他に、ルソンメダカ

(*O. luzonensis*) インドメダカ (*O. curvinotus*) スラウェシメダカ (*O. celebensis*) などを含む約 20 種からなり、アジア全域に種が広く分布し、これら野生種が系統維持されている。従って、異なる環境に生息する種の比較を行う上で非常に有用な生物である。また、rRNA の配列により、メダカ属の種の系統関係も明らかにされており、進化系統学的解析を行うにも便利である。そこで私は、様々な地域に生息するメダカ種の視物質遺伝子を調べ、そのレパートリーや max の種間比較を行うことにより、どのような相違点があるのかを明らかにし、それらが進化的にどのように成立したのか、さらにそれら成立要因が自然選択によるものであるのかを明らかにすることを目的とした。

結果

1. ニホンメダカ全視物質遺伝子の単離と、その吸収波長及び眼球での相対的発現量

ニホンメダカの既存の BAC ゲノムライブラリー及び自作のラムダファージゲノムライブラリーを DNA プロンプによりスクリーニングし、全視物質遺伝子を単離した。その結果、ニホンメダカには青型、赤型に 2 つずつ (*SWS2-A*, *SWS2-B*, *LWS-A*, *LWS-B*)、緑型に 3 つ (*RH2-A*, *RH2-B*, *RH2-C*)、紫外線型 (*SWS1*)、桿体型 (*RH1*) にそれぞれ 1 つずつの計 9 種類の視物質遺伝子が存在することを明らかにした。さらに、それらのゲノム構成は、*SWS2* と *LWS* はゲノム上で隣接して、3 つの *RH2* も隣接して存在し、一方 *RH1* と *SWS1* とはそれぞれ単一コピーであることを明らかにした (図 1)。ニホンメダカ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を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の解析により確認した。このことから、ニホンメダカ視物質遺伝子の遺伝子重複は、魚類の祖先で起こった whole genome duplication によるものではなく、local duplication であることが明らかになった。次に、これら 9 種類の視物質を、培養細胞を用いた系により *In vitro* で再構成し、吸収波長を測定した。その結果、3 種類の *RH2* 及び 2 種類の *SWS2* の max は互いに大きく異なり、一方 2 種類の *LWS* はほぼ同様の値を示すことが明らかとなった (*RH2-A*:452nm, *RH2-B*:516nm, *RH2-C*:492nm, *SWS2-A*:439nm, *SWS2-B*:405nm, *LWS-A*:561nm, *LWS-B*:560nm)。また、*SWS1* 及び *RH1* の max はそれぞれ、352nm、502nm であった。3 種類の *RH2* の max は 452nm から 512nm と約 60nm の大きな差があり、これまで報告されている *RH2* の max 値のほぼ全領域を網羅するものであった。特に *RH2-A* の max は一般的な *RH2* の max (470nm~510nm) に対し、大きく短波長シフトしていた。一方、2 種類の *SWS2* の max の差も約 40nm と非常に大きく、*SWS2-A* が一般的な *SWS2* の max (430nm~450nm) を示すのに対して、*SWS2-B* は大きく短波長シフトしていた。

次に各視物質遺伝子の網膜上での相対的発現量を、リアルタイム RT-PCR により定量し

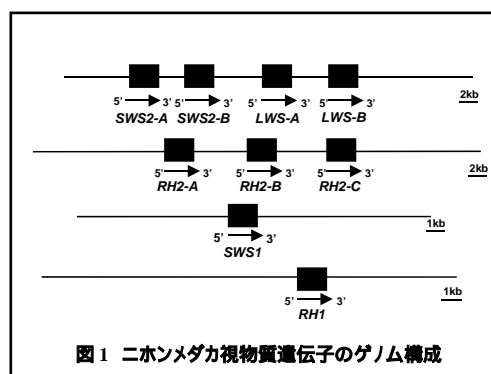


図 1 ニホンメダカ視物質遺伝子のゲノム構成

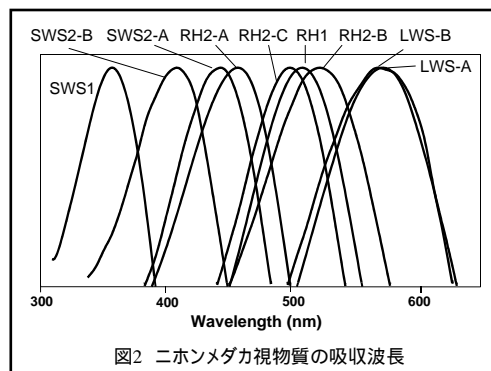


図 2 ニホンメダカ視物質の吸収波長

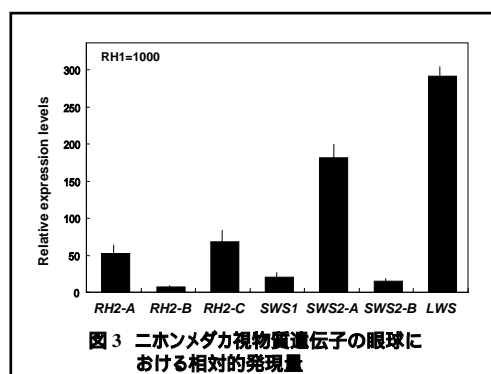


図 3 ニホンメダカ視物質遺伝子の眼球における相対的発現量

た。その際、濃度既知の RNA から各遺伝子の相対的な RT 効率の相違を求めることにより補正した。その結果、赤型、緑型、青型、紫外線型それぞれのタイプ間において相対的発現量に大きな違いが見られた。さらに青型、緑型のサブタイプ間においても発現量に差が見られた (図 3)。

これらの結果は、当研究室で明らかにされているゼブラフィッシュの視物質遺伝子レポーター・吸収波長・相対的発現量の結果と大きく異なっていた。つまり、ゼブラフィッシュとメダカの視物質はそれぞれの種の生息環境に独自に適応したと考えられる。

2. メダカ属における視物質遺伝子の種間比較

メダカ属の種はアジア全域の広い地域に分布している。そこで、様々なメダカ種を比較することにより、視物質遺伝子レポーター・吸収波長・相対的発現量は、生息場所の違いによりどのような相違点があるのかを明らかにすることを試みた。

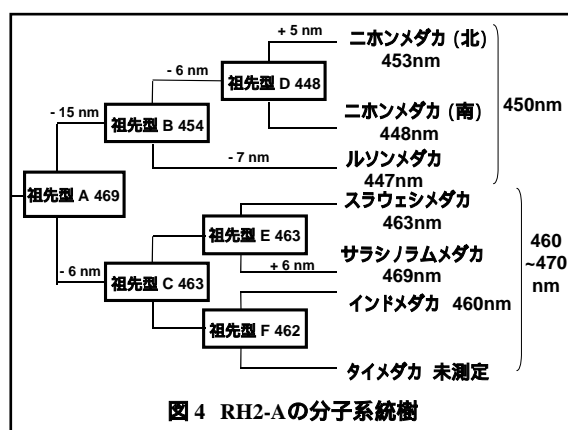
ニホンメダカで明らかにした配列情報を基に、ルソンメダカ、スラウエシメダカ、サラシノラムメダカ、インドメダカ、タイメダカの 5 種から RT-PCR により全視物質遺伝子を単離した。さらに、遺伝子の有無をゲノムサザンハイブリダイゼーションにより確認した。視物質遺伝子レポーターはルソンメダカ、インドメダカはニホンメダカと同様であったが、サラシノラムメダカ、スラウエシメダカ、タイメダカにおいて異なっていた。これら 3 種は共通して *SWS2-A* を欠失し、さらにタイメダカでは *SWS2-B* も欠失しており、サラシノラムメダカの *RH2-B* には 1 塩基の欠失によるフレームシフトが生じていた。濁度の高い水に生息しているタイメダカ、夜行性のサラシノラムメダカは短波長成分の少ない環境に生息していることが知られており、短波長域での細かな波長識別への選択圧が緩んだため、これら欠失が許容されていると推測できる。

次に単離した全視物質の吸収波長を測定し、 λ_{max} を決定した。その結果、SWS1、SWS2-A、SWS2-B、RH2-B、RH2-C において種間で λ_{max} に違いは見られなかった。一方 RH2-A において種間で大きなバリエーションが見られた (ニホンメダカ: 453nm、ルソンメダカ: 447nm、スラウエシメダカ: 463nm、サラシノラムメダカ: 469nm、インドメダカ: 460nm)。

ルソンメダカ、インドメダカ、スラウエシメダカのそれぞれの視物質遺伝子の相対的発現量をリアルタイム RT-PCR により明らかにした。その結果、視物質遺伝子の発現量のパターンは種内での個体差はなく、種間で大きく異なっていた。このことは、メダカは λ_{max} を変えるだけでなく、厳密な発現制御により視物質遺伝子の発現量を調節することでも、生息する光環境に適応していることが示唆された。

3. メダカ緑型 RH2 視物質の吸収波長の進化変遷と自然選択

RH2-A の λ_{max} のみがメダカ種間で大きく異なっていた。そこで、RH2-A の λ_{max} の多様性は進化的にどのように変遷してきたのか、さらにこのような多様性はどのような自然選択によるのかを検討した。まず、遺伝子系統樹のそれぞれの分岐点における祖先型アミノ酸配列を最尤法により推定した。さらにそれら祖先型視物質を点変異導入により実際に作成し、吸収波長を測定した。その結果、祖先型視物質の λ_{max} は祖先型 A: 469nm、祖先型 B: 454nm、祖先型 C: 463nm、祖先型 D: 448nm、祖先型 E: 463nm、祖先型 F:



462nmであった。メダカ属 RH2-A の max は二ホン、ルソンメダカの約 450nm のグループとそれ以外の 460~470nm のグループに分けられるが、これは二ホン、ルソンメダカのグループにおいてより多くの短波長シフトが生じたためであることが明らかとなった。さらに、各枝に起こったアミノ酸の変化を祖先型視物質に対して点変異を導入することにより、どのアミノ酸座位の効果で max のシフトが生じたのかを検証した。その結果、祖先型 A から祖先型 B への 15nm の非常に大きな短波長シフトは 94 番目のアミノ酸座位の効果により生じ、その他の枝におけるシフトは多くのアミノ酸座位の小さな効果の積み重ねにより生じたことが明らかとなった。さらに最尤法によりアミノ酸変化の自然選択を検討したところ、94 番目のアミノ酸座位に強い正の自然選択が検出され、その他のアミノ酸変化は中立進化であることが示された。

一方、RH2-B と RH2-C の max は種間で違いは見られなかった。しかし興味深いことに、RH2-B と RH2-C との系統樹により、遺伝子間で頻繁に gene conversion (遺伝子変換) による配列の均一化が生じたことが示唆された。そこで、遺伝子間での gene conversion を検出する GENECONV を用いて解析したところ、それぞれの種において、RH2-B と RH2-C 間での gene conversion が強く支持された。RH2-B と RH2-C は gene conversion が生じているにもかかわらず、その max は RH2-B では約 512nm、RH2-C では約 492nm と種間で強く維持されていた。このことから、RH2-B と RH2-C との max の約 24nm の差は、gene conversion に抗して維持されている 7 アミノ酸座位によりもたらされていると考えた。そこで RH2-C の配列に対して、7 アミノ酸座位を RH2-B 型のアミノ酸に置換し、吸収波長を測定した結果、RH2-B と同じ max を示した。従って、これら 7 アミノ酸座位のみの効果により RH2-B と RH2-C との max の差が生じたことが示された。さらに最尤法により、7 座位の自然選択を検証したところ、4 つのアミノ酸座位に正の自然選択が検出された。つまり、RH2-A の種間での max の多様化と、RH2-B と RH2-C の max 値の機能分化は自然選択すなわち環境への何らかの適応の結果生じたものであることが示唆された。

結論

二ホンメダカの視物質遺伝子レパートリーとそのゲノム構成を決定し、それら視物質の max と相対的発現量を明らかにした。さらに、メダカ属の 5 種について視物質遺伝子を単離し、その max と相対的発現量を決定した。その結果、メダカは視物質遺伝子レパートリーを変えるだけでなく、相対的発現量を変化させることにより、生息環境に適応してきたと考えられる。また、これらの結果はゼブラフィッシュでこれまで当研究室で明らかにされているパターンとも異なっていた。つまり魚類は遺伝子重複により、多くの視物質遺伝子を持ち、その max や発現量を変え、環境に適応してきたと考えられる。さらに、メダカ緑型視物質の進化的変遷と、それらの自然選択について検討し、緑型視物質が正の自然選択を受けていることを明らかにした。

発表論文

1) [Matsumoto, Y.](#), Fukamachi, S., Mitani, H. and Kawamura, S. (2006). Functional characterization of visual opsin repertoire in Medaka (*Oryzias latipes*). *Gene*, 371 (2): 268-278.