

# 論文内容の要旨

## 論文題目

Regulatory mechanisms for the coordinated expression of duplicated green-sensitive and red-sensitive opsin genes in zebrafish and their evolution

(ゼブラフィッシュ緑型・赤型オプシン遺伝子における  
重複遺伝子間の協調的発現の制御機構とその進化)

氏名

辻村 太郎

### 【序論】

脊椎動物の視覚系オプシンは薄明視に関与する桿体オプシンと明視及び色覚に関与する錐体オプシンに分類される。錐体オプシン視物質の最大吸収波長は主としてオプシンのアミノ酸配列により異なる。生物が色覚を有するためには、それら錐体オプシン遺伝子を複数種有し、さらにそれらを各々異なる錐体視細胞で特異的に発現させることで、異なる波長の光を識別する必要がある。色彩は生物の捕食や性選択において重要な情報で、その色彩を知覚する「色覚」は生物進化にとって重要な要因であり、色覚進化の解明は生物進化を考察する上で重要な知見になる。これまでに多くの生物種でオプシンの遺伝子レパートリーと最大吸収波長が決定され、それらを系統関係や生態環境と結びつけることで色覚進化が論じられてきた。このような研究は、生物の色覚は錐体オプシン遺伝子のレパートリーによって大きく規定されるという考えに基づくものである。しかし、色覚進化の研究としては、この視点だけでは不十分である。なぜなら、上述のように、それらオプシン遺伝子の発現様式も生物の色覚を規定する大きな要因だからである。

現在の錐体オプシンのレパートリーとそれらの発現パターンから、脊椎動物の共通祖先は、4タイプの錐体オプシン遺伝子(紫外線型 SWS1、青型 SWS2、緑型 RH2、赤型 M/LWS)を有し、それらを異なる4種類の錐体視細胞に特異的に発現させていたと考えられている。その後、それぞれの生物系統で遺伝子重複・欠失とアミノ酸置換によりオプシンレパートリーの多様化が生じ、それに応じてオプシンの発現様

式も変化してきた。このときその発現制御機構がどのように変化したのかという問題は色覚進化という観点から極めて重要であるが、そのような視点で行われた研究はほとんどない。

そこで私はゼブラフィッシュの緑型オプシン RH2 及び赤型オプシン LWS に着目した。RH2 には遺伝子重複によって生じた RH2-1, RH2-2, RH2-3, RH2-4 の4種類のサブタイプが存在し、LWS には同様に LWS-1 と LWS-2 の2種類のサブタイプが存在する(図1)。それらの発現する錐体視細胞種は RH2 ならば複錐体副細胞であり、LWS ならば複錐体主細胞であり、サブタイプ間で同一である。しかし、それらの網膜における発現領域はサブタイプ間で互いに異なり、それに応じて吸収波長もサブタイプ間で大きく異なっている。すなわち、RH2、LWS どちらにおいても、短波長側の吸収スペクトルを有するサブタイプ(RH2-1、RH2-2、LWS-2)が網膜の中心から背側にかけて発現し、長波長側に吸収スペクトルを有するサブタイプ(RH2-3、RH2-4、LWS-1)は網膜周縁部、特に腹側で発現する(図1)。このようなオプシン遺伝子のサブタイプ化は水中という多様な光環境に生息する魚類に共通して見られるが、その遺伝子重複は様々な系統で独立に起きている。従って、これらの発現制御機構は、起源の古い視細胞特異性と起源の新しい網膜発現領域調節という2つの視点から捉えることができ、オプシン発現制御機構の進化プロセスに迫るモデルとして適していると考えられる。よって、本研究ではゼブラフィッシュ RH2 及び LWS 両者の発現制御機構を解明し、その進化的成り立ちを明らかにしていくことを目的とした。

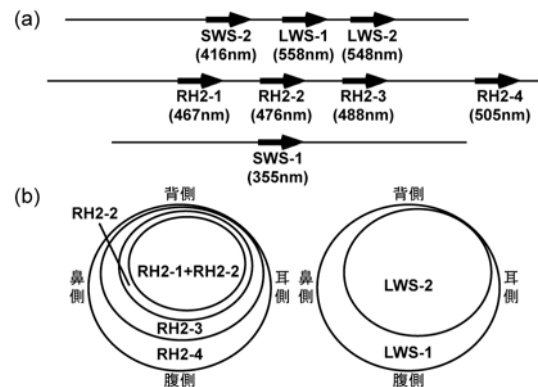


図1 (a)ゼブラフィッシュ全錐体視物質遺伝子のゲノム構成。括弧内は各視物質の最大吸収波長。(b)網膜におけるRH2、LWSそれぞれのサブタイプ遺伝子の発現パターン。

## 【結果】

### 1. 緑型RH2の発現制御機構の解析

これまでに、当研究室の知念の研究により、RH2-1の上流15kbに位置する499bpの領域(RH2-Locus Control Region, RH2-LCR)がエンハンサー活性を有する領域として同定されていた。しかし、各RH2遺伝子の発現におけるRH2-LCRの実際の機能はまったく不明であった。

#### (1) GFP組み換えRH2-PACによる内在RH2遺伝子の発現の再現

当研究室で、4つすべてのRH2遺伝子を含むインサート長85kbのPACクローン(RH2-PAC)が単離されていた(図2)。私は、このRH2-PACであれば、各RH2遺伝子の発現を正確に再現できると考えた。そこで、RH2-PACで各RH2遺伝子を緑色蛍光タンパク質GFP遺伝子に置換したレポーターコンストラクト(RH2/GFP-PAC)を作製し(図2)、それらをゲノム中に保持するゼブラフィッシュのトランスジェニックライン(Tg)を樹立し、そのF1またはF2個体においてGFPの発現を観察した。すると、RH2-1、RH2-2、RH2-3、RH2-4のすべてについて、それぞれを置換したGFPは内在の各RH2遺伝子の発現を再現していた。よってRH2-PACが十分な発現制御領域を含むことが示された。

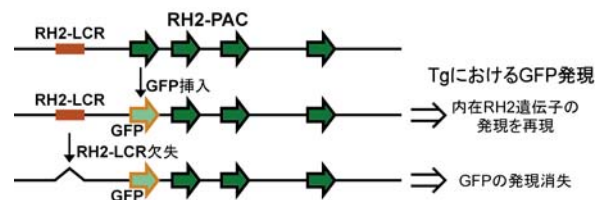


図2 RH2-PACの改変。各RH2遺伝子の位置にGFP遺伝子进行挿入し、さらにRH2-LCRを欠失させた。

#### (2) RH2-LCRの機能解析とその進化的考察

RH2-PACにはRH2-LCRが含まれる。そこで、各RH2/GFP-PACからRH2-LCRを欠失させたときの

GFP 発現を調べた(図2)。すると、複錐体副細胞における GFP の発現はどれにおいても誘導されなかった。この結果より、RH2-LCR が、4つすべての RH2 遺伝子が複錐体副細胞で発現するのに必要な領域であることを初めて示した。

次に、RH2-LCR だけで複錐体副細胞特異性を規定できるのかを調べるために、RH2-LCR を本来皮膚で発現する遺伝子である keratin8 の直上プロモーターに付加した。すると、複錐体副細胞における特異的な発現を誘導した。よって RH2 遺伝子の発現における複錐体副細胞特異性が RH2-LCR により規定されていることを示すことができた。

次に、ゼブラフィッシュとメダカの間で RH2 遺伝子座の DNA 配列の比較を行った。すると、RH2-LCR の位置に突出した相同性が検出された。ゼブラフィッシュとメダカの種が分岐したのは、ゼブラフィッシュで RH2 が遺伝子重複する以前である。よってこの結果は、遺伝子重複以前の祖先型 RH2 では、RH2-LCR が単コピー RH2 遺伝子の複錐体副細胞特異的な発現を誘導していたことを意味する。そして、その後 RH2 遺伝子の重複が RH2-LCR を含まない形で起き、それにより現在の発現制御機構の土台ができたと考えられる(図3)。

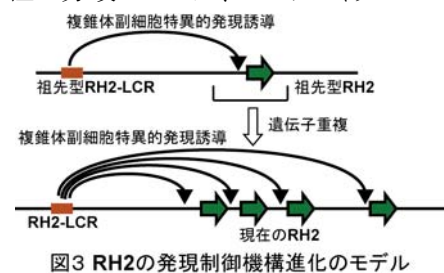


図3 RH2の発現制御機構進化のモデル

### (3) RH2 サブタイプ遺伝子間の発現パターン分化機構の解析

次に、遺伝子重複の後、4つの RH2 サブタイプ遺伝子間で網膜における発現パターンが分化した機構を明らかにしたいと考えた。まず、RH2-LCR に各 RH2 遺伝子の直上領域を付加した GFP コンストラクトによる GFP 発現を解析した(図4)。すると、RH2-1とRH2-2については、GFP は網膜の中心から背側にかけて発現し、実際の発現パターンと類似していた。RH2-3については網膜の全域で一様に発現しており、実際の発現パターンとは大きく異なるものであった。RH2-4については網膜の全域で非常にまばらに発現しており、やはり実際の発現パターンとは異なるものであったが、腹側領域でより高頻度に GFP 発現細胞が見られた。これらの結果は、各直上領域に何らかの網膜領域特異性が存在することを示唆するが、それらだけでは発現パターンの特異性を説明できないことも明らかにした。

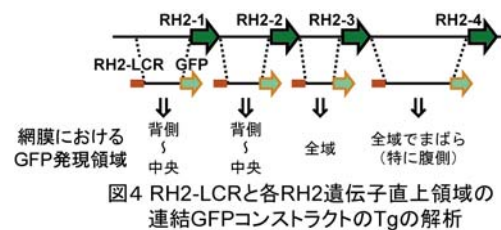


図4 RH2-LCRと各RH2遺伝子直上領域の連結GFPコンストラクトのTgの解析

そこで私は、各サブタイプ遺伝子間のゲノム上における位置の違い、特に RH2-LCR との相対的位置の違いに着目した。そこで、RH2-3/GFP-PAC において、RH2-LCR を RH2-3 の直下に移設したコンストラクトを作成し、その Tg を樹立したところ、GFP は網膜の中心から背側にかけて発現していた(図5)。これは、本来 RH2-LCR に最も近い位置にある RH2-1 の発現パターンと似たものであった。この結果は、各 RH2 遺伝子の発現パターンが、各々の位置の違いによっても分化したことを示唆するものである。

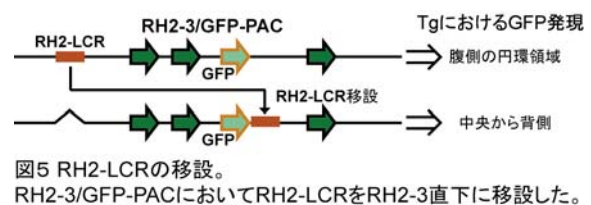


図5 RH2-LCRの移設。RH2-3/GFP-PACにおいてRH2-LCRをRH2-3直下に移設した。

## 2. 赤型LWSの発現制御機構の解析

### (1) GFP、DsRed 組み換え LWS-PAC による内在 LWS 遺伝子の発現の再現

私は、緑型 RH2 の時と同様に、赤型 LWS についても、十分に大きな PAC クローンを用いて発現制御機構の解析を行うことにした。私は、LWS-1、LWS-2 を含むインサート長 110kb の PAC クローン (LWS-PAC) を単離し、それに十分な発現制御領域が含まれていることを示すことができた。

## (2) LWS-1 上流域に存在する制御領域の、LWS-1 と LWS-2 の発現における必要性の検討

これまでに、当研究室の細谷の修士論文における研究により、LWS-1 の上流 1.3kb~0.6kb に位置する DNA 制御領域 LWS Activating Region (LAR) が同定され、それが LWS-2 の発現を網膜で誘導できることが明らかにされていた。しかし、LWS-1 と LWS-2 の発現における LAR の必要性は示されていなかった。そこで、LWS-PAC から LAR を欠失させたときの発現を解析したところ、LWS-1 と LWS-2 の両者の著しい発現低下が見られた。しかし、微かに認められたそれらの発現の特異性は失われてはいなかった。以上の結果から、LAR は、LWS 遺伝子の発現特異性の決定には必須ではないが、少なくとも LWS-1 と LWS-2 の共通の発現誘導活性化領域の一つとして機能していることが示された。

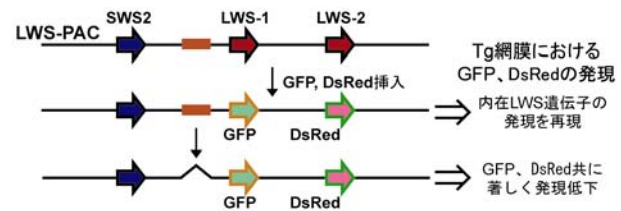


図6 LWS-PACの改変。  
LWS-1にGFP遺伝子を挿入し、LWS-2にDsRed遺伝子を挿入した。  
さらに、LWS-1の上流1.3~0.6kbの領域を欠失させた。

### 【結論】

ゼブラフィッシュの緑型 RH2 及び赤型 LWS 各サブタイプ遺伝子の発現を、それぞれ RH2-PAC クローン、LWS-PAC クローンをを用いて再現した。緑型 RH2 については、遺伝子重複以前の祖先型 RH2 において複錐体副細胞特異的な発現誘導を担っていた領域が、遺伝子重複後の現在、RH2 遺伝子座において RH2-LCR として唯一保存されており、それが4つすべての RH2 遺伝子の複錐体副細胞特異的な発現を制御していることを明らかにした。重複 RH2 遺伝子間の発現パターンの分化においては、各 RH2 遺伝子の直上領域が網膜における発現領域特異性を一部獲得したことに加えて、各 RH2 遺伝子の RH2-LCR との相対的な位置関係も重要な役割を果たしたことを示唆した。LWS についても、やはり LWS-1、LWS-2 両遺伝子の発現を調節する共通の制御領域が存在することを示した。このことは、RH2 と LWS それぞれにおいて「単一制御領域による発現誘導」という同様の機構が収斂的に進化したことを意味する。RH2 における発現パターン分化と LWS における発現パターン分化との間には、多くの類似性が見られる。「単一制御領域による発現誘導」という共通の機構がそのような類似性を生み出した要因の一つであると考えられる。

### 【発表論文】

Tsujimura, T., Chinen, A. and Kawamura, S. (2007). Identification of a locus control region for quadruplicated green-sensitive opsin genes in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104 (31):12813-12818.