

論文内容の要旨

論文題目

L-M オプシン塩基配列情報を用いた霊長類における 色覚多様性の探索と集団遺伝学的解析

氏名 樋渡 智秀

霊長類の赤-緑(L-M)オプシン遺伝子はX染色体上に存在する。狭鼻猿類(ヒト、類人猿、旧世界ザル)ではこのL-Mオプシンが遺伝子重複し、LオプシンとMオプシンに分化しており、常染色体性の青(S)オプシンとあわせて恒常的3色型色覚を有している。また、原猿と多くの哺乳類ではSオプシンとLまたはMのオプシン遺伝子しか存在しないため、基本的に2色型色覚である。一方、新世界ザルでは、Sオプシンに加え、X染色体上の一座位にL-Mオプシン遺伝子が対立遺伝子多型として存在するため、個体によって2色型、3色型色覚が存在する。新世界ザルにおいてX染色体を一本しか持たないオスでは常染色体上のSオプシンを加え、常に2色型となる。また、X染色体を二本持つメスで、対立遺伝子をホモ接合で持つ場合は、オスと同様に2色型であり、また、その中でもヘテロ接合で持つ場合は3色型色覚となる。このように新世界ザルは同一集団内に異なる色覚を持つ個体が混在するというユニークかつ多型的な色覚を持っている。

新世界ザルの色覚は著しい種内多型を示し、ヒトの色覚多型の生物学的意義を検証する上で優れたモデルとなる。この色覚多型は約2500万年以上も持続してきたと考えられ、それゆえこの多型持続をヘテロ超優性選択等の平衡選択による積極的維持により説明する研究者が多い。しかし、フィールドワークの行動観察からは、新世界ザル3色型色覚の適応的意義は明確ではない。また、遺伝的浮動における中立突然変異の集団中での持続時間の期待値の決定要因である有効集団サイズも未解明である。さらに、集団サイズの変動や集団の融合、分集団を無視したサンプリングといった効果も多型性を生み出す原因となる。そこで、このような可能性まで考慮に入れて、野生の新世界ザルの集団に対してL-Mオプシンの平衡選択の検証を行う必要がある。

一方、狭鼻猿類の中でヒトだけは、LあるいはMオプシン遺伝子が欠失した2色型色覚であるいわゆる、赤緑色盲や、LとMオプシン遺伝子がキメラになった異常3色型色覚であるいわゆる赤緑色弱といった色覚多型がヒト、特に男性で約3~8%と高頻度で観察される。これはLオプシン遺伝子とMオプシン遺伝子の塩基配列類似性は約96%と非常に高く、そのためLオプシ

ン遺伝子と M オプシン遺伝子間で非相同組換えを起こしやすいためと考えられている。それに対して、ヒト以外の狭鼻猿類で実際に数字で見ると、このような赤緑色盲および赤緑色弱の頻度はカニクイザルでは 3153 頭のうち 3 頭(Onishi et al., 1999)、頻度にして 0.1%以下であり、チンパンジーでは 146 頭のうち 1 頭(Saito et al., 2005; Terao et al., 2005; Verrelli et al., 2008)と頻度にして 1%以下しかキメラが検出されておらず、極めて低い。しかし、カニクイザルを含むマカク類とチンパンジー以外では L-M オプシン遺伝子の集団調査行われておらず、狭鼻猿類全体での色覚多様性は明らかではない。さらに塩基配列の多型性についての解析は、ヒトとチンパンジーにおいて L オプシン遺伝子のみしか行われておらず、M オプシン遺伝子についても集団の塩基配列を収集し、解析を行った例は存在しない。さらにマカク類に関しては遺伝子型のみで、そもそも塩基配列レベルでの解析ができないという問題点も存在する。ここで、L オプシン遺伝子のみでは何が問題になってくるのかという、それは L と M オプシン遺伝子間での塩基配列のシャッフリング現象、すなわち遺伝子変換(gene conversion)の影響を評価できないことである。

そこで、本研究において、もう一つのテーマとしてヒト、チンパンジー、マカク類以外での色覚多型の知見のない狭鼻猿類について L と M オプシン遺伝子の両方について、エクソンだけではなくイントロンについても塩基配列を調べ、多型性を評価し、さらに L と M オプシン遺伝子の遺伝子変換が狭鼻猿類の色覚進化に及ぼす影響について解析を行いたいと考えた。

上述のように、霊長類の中でヒトと新世界ザルにおいては色覚多型性が報告されているが、これまで、それらも含めて霊長類について L-M オプシン遺伝子の塩基配列レベルでの多型性に着目した研究はほとんどなく、色覚多型性に対する自然選択について、集団遺伝学的なアプローチはこれまでほとんど行われてこなかった。そこで、霊長類全体における色覚多型性の解明並びに、その適応的意義の理解を行うことを目的とした。

以上の理由から、私は行動観察から 3 色型色覚の有利性が明確でなく、生態及び色覚の点で異なるノジロオマキザル (*Cebus capuchin*)とチュウベイクモザル(*Ateles geoffroyi*)の野生の一集団を対象に、L-M オプシン遺伝子の多型性の評価を行い、その色覚多様性進化機構について明らかにすることにした。そして、狭鼻猿類では、色覚多型性が未知であり、多様な生態を示すテナガザルを対象として、L-M オプシン遺伝子の多型性の評価を行い、その色覚多様性進化機構について明らかにすることにした。

結果と考察

1. 塩基多様度π(新世界ザル)

クモザルにおいては L-M オプシン遺伝子 exon1~exon6 を中心とした intron を含む領域約 1kbp ずつ、合計 6041bp と、オマキザルにおいては exon1, exon3,exon5,exon6 の合計 3958bp と中立対象領域として選んだ pseudogene や他の遺伝子の intron 領域約 0.5kbp ずつの塩基配列決定を行った。その結果、L-M オプシン遺伝子では中立と比較して 5~10 倍程度の高い塩基多様度を示した。(Table.1)

Table.1 DNA 多型まとめ

Species	Region	No. of chromosomes (n)	No. of sequencing sites(S)	n	S	π	P	
				1	1	0.02	1	
Spider monkey	Exon 1 (940 bp)	48	2	0.17	1	0.02	1	
	Exon 2 (1015 bp)	44	18	7.38**	<0.0001	4.08**	0.0009	
	Exon 3 (1011 bp)	46	24	11.09**	<0.0001	5.33**	<0.0001	
	Exon 4 (982 bp)	48	17	10.00**	<0.0001	8.24**	<0.0001	
	Intron 4 (277 bp)	48	15	7.72**	<0.0001	4.08**	0.0009	
	Exon 5 (1044 bp)	52	12	6.69**	<0.0001	3.04*	0.02	
	Exon 6 (999 bp)	46	5	1.93	0.2	1.27	0.6	
	Total (6041 bp)	48	93	6.92**	<0.0001	3.52**	0.004	
	Orangutan monkey	Exon 1 (1006 bp)	31	8	3.98**	0.0003	1.95*	0.02
		Exon 3 (1072 bp)	31	32	12.48**	<0.0001	7.47**	<0.0001
Exon 5 (1044 bp)		31	27	11.06**	<0.0001	6.69**	<0.0001	
Exon 6 (936 bp)		31	21	11.39**	<0.0001	6.28**	<0.0001	
Total (3958 bp)		31	88	9.39**	<0.0001	5.53**	<0.0001	
Spider monkey		ψ-globin pseudogene (329 bp)	64	4	1.36	0.7	1.6	0.7
		ψWF intron 11 (502 bp)	64	7	3.08	0.1	2.54	0.2
	TF intron 5 (551 bp)	64	3	1.29	0.8	1.15	0.9	
	B2a intron 2 and 3 (371 bp)	64	0	0	1	0	1	
	S opsin intron 4 (523 bp)	64	5	3.03	0.1	2.03	0.4	
	Total (271 bp)	64	19	1.77	0.5	1.48	0.7	
	Orangutan monkey	ψ-globin pseudogene (500 bp)	46	2	1.83	0.1	0.91	0.5
		ψWF intron 11 (500 bp)	46	1	0.18	1	0.46	0.9
		TF intron 5 (500 bp)	46	0	0	1	0	1
		B2a intron 2 and 3 (500 bp)	42	2	1.06	0.4	0.93	0.5
S opsin intron 4 (500 bp)		46	1	0.93	0.5	0.46	0.9	
Total (2500 bp)		42	6	0.83	0.5	0.56	0.8	

2. コアレッセンスシミュレーション(新世界ザル)

中立遺伝子の π の平均値を求め、シミュレーションにより集団突然変異率 θ の分布を求めた。その θ を用いてさらにシミュレーションによって中立仮定下で期待される π の分布を求めた。尚、中立遺伝子は常染色体性であるため、分布の各値を 3/4 倍し、用いた。その結果、L-M オプシン遺伝子の π は中立仮定の場合より有意に大きいことがわかった。(Figure.1)

3. Tajima's D検定(新世界ザル)

L-M オプシン遺伝子の各 exon 領域と中立遺伝子に対し Tajima's D 検定を行った(Table.1)。中立遺伝子の D の値は、L-M オプシン遺伝子の D に比べ 0 に近く、これらの領域が中立であることに矛盾しない。また、この集団の有効集団サイズに大きな変動が無かったこと、分集団の混合がないこと、分集団からのサンプリングが無いことも支持している。これに対し、L-M オプシン遺伝子の中央領域における D は正の値を示した。中立遺伝子の π の平均値を用い

てシミュレーションにより求めた集団突然変異

率 θ を用い、中立状態で期待される D の分布を求め、その分布からの L-M オプシン遺伝子の各領域の実測値 D のずれを検定した。その結果、各 exon は中立仮定の場合から有意に逸脱していることが明らかになった(Table.1)。このことは M/LWS オプシンの多型性が平衡選択によるものであることを示している。

4. 遺伝子型解析(テナガザル)

L-M オプシン遺伝子の最大吸収波長 λ_{max} は exon3 と exon5 中の 3 つのアミノ酸サイト(3 サイトルール)から推定できる。そこで、解析対象としたテナガザル 3 属 8 種 158 個体について 3 つのアミノ酸サイトの構成を調べた。その結果、L-M オプシン遺伝子に失欠型、キメラ型は存在せず、全て正常型個体であることがわかった。

5. 系統ネットワーク(テナガザル)

遺伝子型解析を行った各個体について、L-M オプシン遺伝子の 3 サイトを含む exon3-5 領域と同遺伝子の intron を含む領域の合計 3.6kbp の塩基配列を決定した。また、exon の配列情報を元に、系統ネットワークの作成を行った。その結果、テナガザルの exon では、組み換えに対する明確な証拠は得られず、組み換え体への

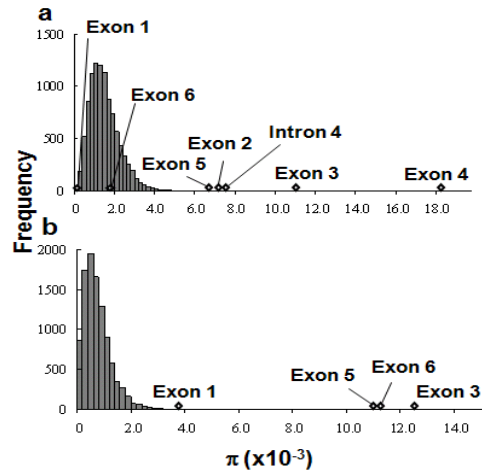


Figure.1 中立仮定下における塩基多様度 π の理論分布と実測値 a=クモザル b=オマキザル

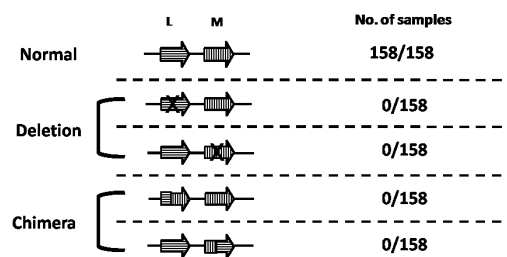


Figure.2 テナガザル 3 属 8 種 158 個体における L-M オプシン遺伝子型頻度

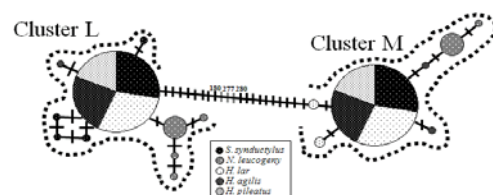


Figure.3 系統ネットワーク

強い淘汰圧を示唆する結果を示した。

6. 塩基多様度 π と塩基相違度(テナガザル)

本研究においてテナガザルの L,M 両方について、Intron の集団の配列を取得し、解析を行い、多型性を評価、並びに L と M 間の gene conversion の及ぼす影響の検証を行う目的で L,M 両方について、これまでの 3 サイトを含む Exon3 ~5 とは別に、テナガザル 3 属 8 種 101 個体について Intron3, Intron4 の領域の塩基配列情報の取得を行った。得られた配列を元にテナガザル 3 属について L-M オプシン遺伝子を領域ごとに分けて塩基多様度を求めた。また、Neutral, 中立対照領域、こちらはテナガザルより、 η グロビンシュードジーン、と S オプシンのイントロンといった、中立と考えられる 2 領域につ

いてそれぞれ配列の取得を行い、塩基多様度を求めた。

その結果中立対照領域では 1.0 程度を示し、Intron はそれと同程度、あるいは若干、高い値となった。一方、Exon に関しては非常に多型性が低く保存的であることがわかった。(Figure.4) L と M の配列間の違いをグラフにした結果、上述の L-M オプシン遺伝子の領域ごとの塩基多様度 (%) のグラフとは逆に Exon では違いが大きく、それと比較して、Intron では違いが小さいことがわかった。さらに、上述の塩基多様度のグラフを加えると、Intron では同程度の高さ、Exon では低い値をとることがわかった。これは intron において塩基の違いと、塩基の多型性が同程度であることを意味しており、テナガザルの Intron では gene conversion が起こっており、Exon では gene conversion は起こっているが、排除されている現象であることがわかった。(Figure.5) これらのパターンは purifying selection を示し、選択圧の存在が示唆される結果となった。

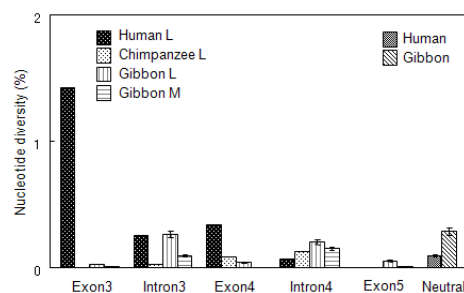


Figure.4 L-M オプシン遺伝子の領域ごとの塩基多様度 (%)

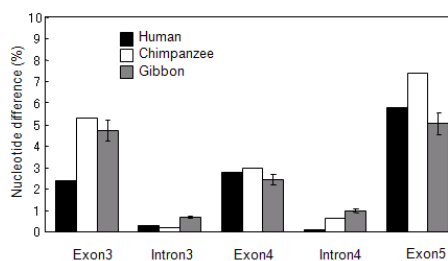


Figure.5 L-M オプシン遺伝子における L と M の配列間の違い

結論

新世界ザルでは平衡選択が検出され、また、得られた配列を解析した結果、Exon, Intron を含めた領域において配列レベルでの多型性が観察された。一方、狭鼻猿類ではテナガザルには多型性が Exon では見られず、Intron では gene conversion による多型が観察され、典型的な purifying selection であると解釈できる。また、新世界ザルでは balancing selection テナガザルでは purifying selection がそれぞれ示され、対照的な選択圧がかかっていることが明瞭に示された。今回、新世界ザル、テナガザルの L-M オプシン遺伝子の多型を解析することにより今後、ヒトとの比較における基礎データとして活用していくことができると考えられる。