

博士論文

カレイ目視覚オプシンの分子進化学的研究

笠木 聡

[目次]

| | |
|--|-------|
| 【総導入部】 | p. 1 |
| 【第一章：マツカワ (<i>Verasper moseri</i>) の視覚オプシンレパートリーとその機能解析】 | |
| 1.1 背景 | p. 6 |
| 1.2 材料と方法 | p. 7 |
| 1.2.1 実験に供したマツカワ試料 | |
| 1.2.2 核酸の抽出および PCR 増幅 | |
| 1.2.3 cDNA クローニングおよび配列決定 | |
| 1.2.4 系統解析 | |
| 1.2.5 サザンブロット解析 | |
| 1.2.6 視物質再構成 | |
| 1.2.7 オプシン遺伝子発現量の定量 | |
| 1.2.8 統計処理 | |
| 1.3 結果 | p. 14 |
| 1.3.1 マツカワ視覚オプシンレパートリーの解明 | |
| 1.3.2 マツカワ視覚オプシンの吸光スペクトル | |
| 1.3.3 成長に伴うマツカワオプシン遺伝子の発現変動 | |
| 1.4 考察 | p. 16 |
| 1.4.1 マツカワにおけるオプシンと生理機能および生活史の関連 | |
| 1.4.2 RH2-A の偽遺伝子化と SWS2A の長波長化の関連 | |
| 【第二章：マツカワ属における SWS2A オプシンの長波長化と RH2-A 機能消失】 | |
| 2.1 背景 | p. 20 |
| 2.2 材料と方法 | p. 21 |
| 2.2.1 実験に供したカレイ目魚種試料 | |
| 2.2.2 核酸の抽出および増幅 | |
| 2.2.3 オプシンの cDNA またはゲノム DNA 断片クローニング | |
| 2.2.4 サザンブロット解析 | |
| 2.2.5 系統解析 | |
| 2.2.6 カレイ目オプシン cDNA のアミノ酸配列比較 | |
| 2.2.7 最尤法を用いたオプシンの dN/dS 比較 | |
| 2.2.8 オプシン祖先配列の推定 | |
| 2.2.9 視物質再構成による最大吸収波長測定 | |
| 2.2.10 人工的点変異導入 | |

| | |
|---|-------|
| 2.3 結果 | p. 26 |
| 2.3.1 カレイ目魚種の視覚オプシンレパートリーおよび mRNA 発現の比較 | |
| 2.3.2 カレイ目魚種の視覚オプシン配列比較 | |
| 2.3.3 視物質再構成によるカレイ目 SWS2A の機能解析 | |
| 2.4. 考察 | p. 30 |
| 2.4.1 カレイ目視覚オプシンの特徴 | |
| 2.4.2 RH2 サブタイプの進化 | |
| 2.4.3 SWS2A の分子進化 | |
| 2.4.4 カレイ目の視覚機能と生態との関連 | |
| 【第三章：マツカワ非視覚オプシンの探索と発現解析および吸収波長解析】 | |
| 3.1 背景 | p. 36 |
| 3.2 材料と方法 | p. 37 |
| 3.2.1 マツカワ組織試料 | |
| 3.2.2 核酸の抽出、RT-PCR および cDNA クローニング | |
| 3.2.3 組織発現解析 | |
| 3.2.4 視物質再構成 | |
| 3.3 結果 | p. 40 |
| 3.3.1 マツカワ非視覚オプシンのレパートリー解明 | |
| 3.3.2 マツカワ非視覚オプシンの組織発現 | |
| 3.3.3 マツカワ非視覚オプシンの最大吸収波長測定 | |
| 3.4 考察 | p.41 |
| 3.4.1 非視覚オプシンの発現組織 | |
| 3.4.2 緑色光受容性の非視覚オプシン | |
| 【総合考察】 | p. 44 |
| 【謝辞】 | p. 47 |
| 【図表の説明】 | p. 48 |
| 【参考文献】 | p. 53 |

【総導入部】

脊椎動物を脊椎動物たらしめる形態的特徴は頭部から尾部を貫く脊椎の存在、ならびにそこにおいて発達した中枢神経組織である。リン酸カルシウムによって構成される丈夫な骨組織は発達した脊髄を保護し、同様に発達した頭蓋骨で保護し支持することによって脳の発達を可能にした (Gilbert 2006)。発達した脳は高次の情報処理を行うことが可能になり、様々な新しい機能の獲得につながった。高次の脳機能の代表的な例が感覚である。脊椎動物の進化初期段階において、すなわち顎口上鋼の出現に前後して、脊椎動物に共通の特徴である眼球が出現したことがヤツメウナギ等の比較研究にて示されている (Warrant 2015)。脳が高度に発達したことにより処理できる情報の量が増加することと、専門の感覚器官が発達することには密接な関連があると考えられる。

眼球は視覚を担う。脊椎動物の眼球はレンズ (水晶体) と網膜からなるレンズ眼である。レンズ眼はカメラと構造が似ている。光の入力と屈折を担うのがレンズであり、フィルム (あるいはデジタルカメラの CCD センサー) にあたり光情報が結像するのが網膜である (Ross and Pawlina 2006)。網膜は視細胞 (錐体および桿体)、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞および神経節細胞からなる層構造の神経組織である。レンズを通じて眼球内に入射した光は視細胞により受容され、視細胞において発生した神経興奮は水平細胞による調節を受けながら双極細胞へと伝達され、続いてアマクリン細胞の調節を受けつつ神経節細胞へと伝達される。神経節細胞は視床下部の視交叉を經由し、ヒトでは大脳の視覚野へと投射されたのちに視覚情報として高次の処理を受ける (Rodieck 1998)。

視細胞の外節膜に存在し光受容を担う分子が視物質である。視物質は吸光団であるレチナールとオプシタンパク質から構成される。レチナールは 11-*cis*、3,4-dehydro 11-*cis* など複数の構造をとる。レチナール自体は紫外域に吸光をもつが (357 nm, *in vivo*)、オプシタンパク質とシッフ結合することにより周囲の電子状態が変化し、オプシタン

パク質の配列に応じた様々な吸光 (代表的に最大吸収波長 [λ_{\max}] で表現する) を示す。視物質が光を吸収し、レチナールが *all-trans* へと光異性化し、オプシンに結合する G タンパク質が活性化されることにより視細胞の興奮が始まる (Alberts et al. 2002)。

一つの錐体細胞には原則的に 1 種類の視物質が存在する。すなわち 1 種類のオプシントタンパク質 (およびレチナール) で構成される視物質だけが存在する。よって一つ一つの錐体細胞が、細胞単位で特定の光波長で興奮する細胞となる。桿体細胞においてもレチナールと桿体オプシントタンパク質 (ロドプシン、RH1) で構成された視物質が一つの桿体に 1 種類存在するが、桿体細胞は明るい環境では機能しない。薄暗い環境になると桿体細胞が機能し、錐体細胞は光量が足らずに機能しない。これは薄明視とよばれ、感度に優れた桿体視物質およびシグナル伝達系が担う非色覚的視覚機能である (Alberts et al. 2006)。

色覚的視覚機能に関しては、錐体オプシントタンパク質、すなわちオプシン遺伝子の種類が錐体細胞の種類に対応する。これを一般に「何色型色覚であるか」と表現する。例えばヒトは赤錐体 (564 nm)、緑錐体 (534 nm)、青錐体 (420 nm) をもつ 3 色型色覚であり、それぞれの錐体には赤オプシン、緑オプシン、青オプシンが発現している (Rodieck 1998)。

何色型色覚であるか、つまり何種類のオプシン遺伝子を持ち合わせているか、は生物種によって大きく異なる。一般的な哺乳類では、赤から緑色に λ_{\max} を示す M/LWS オプシンと、莖色から近紫外域に λ_{\max} を示す SWS1 オプシンの二種をもつ。霊長類のうちヒトを含む狭鼻下目は例外的に M/LWS オプシンが遺伝子重複および分化した結果恒常的な 3 色型の色覚をもっている (Kawamura 2016)。哺乳類以外では円口類 (ヤツメウナギなど)、軟骨魚類も含めた魚類から両生類、爬虫類、鳥類までが M/LWS オプシンと SWS1 オプシンの他に緑色に λ_{\max} を示す RH2 オプシンと青色に λ_{\max} を示す SWS2 をもっている (Lagman et al. 2013)。このことから、少なくとも脊椎動物の共通祖先種にお

いて M/LWS、RH2、SWS2、SWS1 および桿体オプシン RH1 が存在したと考えられる。

祖先分子を共有するオルソログスなオプシンでも、種間でその λ_{\max} は異なる。例えばマウスの SWS1 オプシンは紫外域である 360 nm に λ_{\max} をもつのに対し、ヒト SWS1 オプシンの λ_{\max} は可視域の 420 nm である (Rodieck 1998)。また、オプシン遺伝子が消失または増加している場合もある。哺乳類に RH2 オプシンや SWS2 オプシンが存在しないのはゲノム中から消失した結果であると考えられている。ヒトを含む狭鼻下目が LWS と MWS の 2 つのオプシンをもつのは前述の通り M/LWS 遺伝子の重複によるものであり、かつそれぞれが赤色と緑色に λ_{\max} をもつのはオプシン遺伝子の突然変異によって機能が分化したことによる (Kawamura 2016)。これらの生物種特異的な色覚の違いは、種々の生物が進化の過程でそれぞれの生息環境に適応した結果だと考えられている。

脊椎動物の中で硬骨魚類、特に大多数の一般的魚類を含む新規亜綱の色覚は種間の差が大きいことが分かってきた。例えば、メダカは LWS が 2 遺伝子、RH2 が 3 遺伝子、SWS2 が 2 遺伝子、SWS1 が 1 遺伝子、RH1 が 1 遺伝子存在する (Matsumoto et al. 2006)。一方グッピーにおいて LWS は 4 遺伝子、RH2 は 2 遺伝子存在する (Kawamura et al. 2016)。またゼブラフィッシュでは RH2 は 4 遺伝子、SWS2 は 2 遺伝子存在する (Chinen et al. 2003)。また、それぞれのオプシンの最大吸収波長は様々に異なっている。このように多くの魚類は固有のオプシンレパートリーを持つ。この事は、水中が陸上に比べて明度の変化が激しく、色情報の重要性が高いことを反映しているためと考えられている (Wilkins et al. 2016)。

近年、カレイ目の魚種であるマツカワにおいて興味深い現象が報告された。マツカワを白色の水槽と黒色の水槽で飼育した場合、白色の水槽で飼育した方が良好な成長を示すというものである (Yamanome et al. 2005)。白色水槽と黒色水槽の違いは水槽の色であり、白色と黒色の違いとは光の反射率の違いである。つまり、飼育時の照射光に成長

を促進する成分が含まれており、白色水槽では黒色水槽よりもその成分が多く反射されマツカワに届いた結果、成長の促進につながったと推測された (Yamanome et al. 2009)。この推論を検証するために、様々な色フィルターを用いて特定波長光を照射した飼育実験がマツカワで行われた。その結果、緑色および青色の光を照射した個体は赤色の光を照射した個体よりも良好な成長を示した (Yamanome et al. 2009)。また、発光ダイオード (LED) を照明として用いた特定波長光照射飼育実験でも緑色光の照射により成長が亢進した (Takahashi et al. 2016)。よって推論通りに、特定の波長成分がマツカワの生理的状态を変化させ成長を促した可能性が示唆された。これまで光の強度や照射時間の長短などが魚類に生理学的変化を起こす報告はあったものの、光波長の違いが明確な影響を与えた知見は少ない。

光波長の違いが生理学的影響をおよぼすということは、色覚オプシンのような光波長を識別できる光受容系の関与が強く示唆される。そこで本研究では、マツカワの成長を亢進する特定波長光の受容機構を探る端緒とするため、第一章においてマツカワの眼球に発現する視覚オプシンの探索を行いその機能を解析した。

第一章の結果よりマツカワの色覚機能では緑色光感受性が特徴的であることが明らかとなった。この緑色光感受性の機能はマツカワにおける緑色光照射による成長促進と関係している可能性が示唆された。そこで第二章では他のカレイ目魚種であるホシガレイ、ババガレイおよびヒラメにおいてオプシン遺伝子のレパートリーを探索した。ホシガレイとヒラメは緑色光照射によりマツカワと同様に成長が促進する報告があり (Shimizu et al. 2019)、オプシンの類似性と緑色光照射の効果を比較検討可能なためである。また、ババガレイはこれらカレイ目の中では深海に生息するため、異なる光環境と色覚機能との関連を検討可能であったためである。

第三章では、視覚以外の光受容が成長に影響を与えている可能性を検討する端緒として、マツカワにおける非視覚オプシンの探索と発現解析を行った。また、一部の非視覚

オプシンについては λ_{\max} を測定し、緑色光照射との関連を考察した。

【第一章：マツカワ (*Verasper moseri*) の視覚オプシンレパートリーとその機能解析】

1.1 背景

光環境の変化は体色変化や成長など魚類の様々な生体機能と関連している。サケ科魚類は黒い背地環境では体色を濃く変化させ、白い背地環境では体色を淡くすることで背景色に溶け込むことが可能である (Baker 1963, Rodrigues and Sumpter 1984)。また、日長を長くすることで体成長は促進される (Björnsson 1997)。マツカワ (*Verasper moseri*) もまた光環境の変化に応じて生理学的変化および体色の変化を起こすことが知られている (Mizusawa et al. 2013, Yamanome et al. 2007)。

マツカワは東北地方太平洋沿岸の大陸棚に生息する大型の冷水性カレイである。マツカワは成長に伴い海水面付近から水底付近まで、垂直方向に移住をすることで知られている (Andoh et al. 1999)。マツカワは市場的価値の高さから、養殖や種苗生産が期待されている魚種でもある。光環境と体成長の関連について、マツカワを白背地で飼育すると黒背地で飼育するよりも良好な成長を示すことが報告された (Amiya et al. 2005, Yamanome et al. 2005)。また、白背地においては摂餌量が増加すること (Sunuma et al. 2009)、および硬骨魚類において体色調節と同時に摂食亢進に作用するメラニン凝集ホルモン(以下MCH)の発現量が背地色応答の結果亢進することが報告されている (Amiya et al. 2005, Yamanome et al. 2005)。この現象はコイ (Papoutsoglou et al. 2000) やヨーロッパアンパーチ (Strand et al. 2007) における報告と合致し、MCHの産生が食欲調節の中樞である視床下部で起こることとも齟齬をきたさない。

マツカワの成長に対する青、緑、赤色の光の効果が検討された結果、特定の波長の光、特に緑色光が体成長を亢進することが示された (Yamanome et al. 2009)。光の色が成長に影響を与える事例についてはイエローパーチ (Head and Malison 2000)、コイ、ドンコ、グッピー (Ruchin 2005)、ニジマス (Luchiari and Pirhonen 2008) やクマノミ (Shin et al.

2012) などでも知られている。

環境の光波長の成分は色覚視によって識別される。硬骨魚類の中には高度な色覚能を持つものが多く知られている。硬骨魚類の優れた色覚能は5タイプの視覚オプシンを持つことによって支えられている。すなわち赤感受性オプシンのLWS、緑感受性のRH2、青感受性のSWS2、紫外線感受性のSWS1、薄明視型のRH1である (Kawamura 2011)。例えばゼブラフィッシュは2遺伝子のLWS、4遺伝子のRH2、1遺伝子のSWS2、SWS1、RH1を有する (Hamaoka et al. 2002, Chinen et al. 2003, Morrow et al. 2011) 一方、メダカは2遺伝子のLWS、3遺伝子のRH2、2遺伝子のSWS2、1遺伝子のSWS1とRH1を有する (Matsumoto et al. 2006)。また、マツカワと同様カレイ目魚種であるタイセイヨウオヒョウ (*Hippoglossus hippoglossus*) においても5タイプのオプシンが確認されている (Helvik et al. 2001)。

緑色光による成長促進に関するこれまでの知見から、少なくともマツカワが緑色光受容能を持つことは疑いがない。よって、当研究においては、マツカワ眼球に発現する視覚オプシンを cDNA クローニングによって単離し、培養細胞を用いた視物質再構成により最大吸収波長 (λ_{\max}) を測定し、各成長段階でのオプシン遺伝子の発現量変化を検討することを目的とした。

1.2 材料と方法

1.2.1 実験に供したマツカワ試料

マツカワ (*V. moseri*) 稚魚サンプルは国立研究開発法人水産研究・教育機構 北海道区水産研究所厚岸庁舎にて繁殖および飼育されたものを用いた。各実験に用いたマツカワの成長段階は以下の通りである：3ヶ月齢魚 (平均体重 1.8 g)、15か月齢魚 (380 g)、27ヶ月齢魚 (943 g)。各個体の扱いは北里大学における動物実験等に関する規程 (動物実験規程) に従った。各組織のサンプリングに際しては全個体を 0.05% 2-フェノキシエ

タノール（和光純薬）を用いて麻酔した。眼球または筋肉組織サンプルは解剖の後にドライアイスを用いて速やかに冷凍し、実験に供するまで-80℃ デープフリーザーにおいて凍結保存された。

1. 2. 2 核酸の抽出および PCR 増幅

眼球 total RNA は ISOGEN II（和光純薬）およびミキサーミル MM300（レッチェ）を用いて抽出した。抽出された眼球 total RNA に RNase-free DNase（タカラバイオ）処理を行いゲノム DNA の除去を行った後、標準的なフェノール・クロロホルム抽出とイソプロパノール沈殿を行い精製した。First strand cDNA 合成には PrimeScript II 1st strand cDNA synthesis kit（タカラバイオ）を用いた。ゲノム DNA 抽出は凍結筋肉組織を用いて定法に従って行った（Sambrook and Russell 2001）。cDNA またはゲノム DNA の増幅は TaKaRa ExTaq Hot Start Version kit（タカラバイオ）を用いて定法に従って行った。cDNA の 5' または 3' 末端の配列を決定するため、Rapid Amplification of cDNA Ends（RACE 法）を SMARTer RACE cDNA amplification kit（クロンテック）を用いて行った。PCR 増幅産物はアガロースゲル電気泳動の後、Nucleospin gel and PCR clean-up kit（マッハライ・ナーゲル）を用いて精製した。PCR に用いたオリゴヌクレオチドプライマー（インビトロジェンまたは日本遺伝子研究所）配列を表 1-1 に示す。各オプシンの全翻訳配列を含む PCR 増幅断片を pGEM-T Easy vector kit（プロメガ）を用いてサブクローニングを行い、標準的なアルカリ SDS 法（Sambrook and Russell 2001）によりプラスミド DNA として精製した。

1. 2. 3 cDNA クローニングおよび配列決定

RH2-A 以外のすべてのオプシン遺伝子に対して、翻訳配列の内側部分に設定したプライマーを用いて眼球由来 1st strand cDNA から RT-PCR にて増幅を行った。プライマ

一配列はヒラメ (GenBank accession numbers、LWS: HM107813、SWS2: HM107814、および RH2: HM107815)、Winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*、RH1: AY631036、RH2: AY631037、SWS2: AY631038、および LWS: AY631039)、タイセイヨウオヒョウ (RH2: AF156263、SWS1: AF156264、RH1: AF156265、SWS2: AF316497、および LWS: AF316498) およびメダカ (RH1: AB180742、LWS: AB223051 および AB223052、RH2: AB223053、AB223054 および AB223055、SWS2: AB223056 および AB223057、および SWS1: AB223058) のオプシン遺伝子配列を参考に設計した。次に、各オプシン cDNA の 5' および 3' 端を決定するために、マツカワオプシン遺伝子中央配列の配列から設計したプライマーを用いて RACE 法により cDNA を増幅した。最終的に、5' および 3' 非翻訳領域に設計したプライマーを用いて全翻訳配列を含むように各オプシン cDNA を増幅した。RH2-A に関しては、DNA の部分断片を「internal forward」および「internal reverse」プライマー (表 1-1) を用いてゲノム DNA から PCR を行い増幅した。その後、部分断片の配列にもとづき設計されたプライマー (「inverse PCR forward」および「inverse PCR reverse」、表 1-1) を用いて定法に従ってインバース PCR を行い、上流および下流のゲノム DNA 配列を増幅した (Sambrook and Russel 2001)。最終的に、全翻訳領域を含むゲノム DNA 領域を増幅した。各オプシン遺伝子の cDNA 配列 (RH2-A に関してはゲノム DNA 配列) は pGEM-T クローニングベクターを用いてサブクローニングを行った。精製 PCR 産物およびプラスミド DNA 配列のシーケンシングは BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit および ABI 3130xl genetic analyzer を用いて行った (アプライド バイオシステムズ)。

1. 2. 4 系統解析

マツカワオプシン cDNA 配列から類推されるアミノ酸配列および他の棘鱗上目魚種のアミノ酸比較は MEGA 5.1 (Tamura et al. 2011) ソフトウェアを用いて行った。メダカ

(1. 2. 3 節参照)、ナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*、RH1: AY775108、RH2: JF262086、SWS1: AF191221、SWS2: AF247116 および AF247120、LWS: AF247128)、カダヤシ (*Lucania goodei*、SWS1: AY296735、SWS2: AY296736 および AY296737、RH1: AY296738、RH2: AY296739、LWS: AY296740 および AY296741)、シクリッド (*Maylandia zebra*、SWS2 および LWS: JF262084、SWS1: JF262085、RH2: JF262089、RH1: AY775114) の各オプシン遺伝子および外群としてゼブラフィッシュの VA オプシン (AB035277) を用いた。アミノ酸変異にもとづく遺伝的距離の算出には JTT モデル (Jones et al. 1992) を用い、系統樹は近隣結合法 (Saitou and Nei 1987) によって算出された。樹形の信頼度は 500 回のブートストラップ計算により求めた。

1. 2. 5 サザンブロット解析

1 レーンあたり約 10 µg のマツカワゲノム DNA を制限酵素 *Eco* RI、*Pst* I、*Sac* I (タカラバイオ) のいずれかにより消化し、0.5%アガロースゲルにて電気泳動を行った。泳動後、DNA サンプルを Model 785 真空ブロッター (バイオラッド) を用いて Hybond-N+ ナイロンメンブレン (GE ヘルスケア) に転写し、XL-1500 UV クロスリンカー (Spectroline) を用いて定着させた。ハイブリダイゼーション用のプローブとして、マツカワ各オプシンのエクソン 1 部位を全長 cDNA クローン (1. 2. 3 節) から表 1-1 に示すプライマーを用いて PCR を行い増幅した。マツカワのエクソン 1 部位はメダカの各オプシンオルソログから類推した (Matsumoto et al. 2006)。LWS に関してのみ、エクソン 1 および 2 に相当する部位を増幅した。RH2-A のエクソン 1 はゲノム DNA クローンから増幅した (1. 2. 3 節参照)。増幅された PCR 産物をアガロースゲル精製の後に Alkphos-Direct ラベリングキット (GE ヘルスケア) を用いて標識し、Alkphos-Direct のプロトコルに従ってハイブリダイゼーションを行った。ハイブリ後の洗浄は同プロトコルに従い Primary wash buffer を用い 60°C で行った。Primary Wash buffer は 0.2M の NaCl と 0.1% の SDS を

含むため約 80%の相同性までが許容される計算になる (Sambrook and Russell 2001)。シグナル検出は CDP-Star および Hyperfilm ECL(ともに GE ヘルスケア)を用いて行った。

1.2.6 視物質再構成

マツカワオプシン cDNA クローンより、表 1-1 に示すプライマー (pMT5 forward および reverse) を用いて全翻訳領域の PCR を行った。フォワードプライマーには開始コドン上流に *Eco* RI の認識配列を付加し、リバースプライマーには終止コドンを変更して *Sal* I の認識配列を付加した。PCR 産物に *Eco* RI および *Sal* I による制限酵素処理を行った後、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿により精製し、発現ベクター pMT5 (Khorana et al. 1988) にクローニングを行った。pMT5 にはウシロドプシン C 末端の 15 アミノ酸がコードされており、1D4 モノクローナル抗体による精製が可能である (Kawamura and Yokoyama 1998)。pMT5-オプシン cDNA クローンの DNA シーケンシングを行い、元の pGEM-T 全翻訳領域クローンと同一の配列であることを確認した。各オプシンの pMT5 クローンプラスミド DNA を、Nucleobond Xtra Maxi EF キット (マッハライ・ナーゲル) を用いて精製した。

RH2-B、SWS2A および RH1 の COS1 細胞 (理研バイオリソースセンターより供与) への一過性導入は DEAE-デキストラン法 (Oprian et al. 1987) を用いて行った。15 cm プラスティック培養皿 (コンフルエント時約 $1.2-1.4 \times 10^7$ 細胞) に対して 15 μ g のオプシン cDNA-pMT コンストラクト DNA を導入した。DNA 導入後約 45 時間の培養を行った。15 枚の 15 cm 培養皿分 COS1 は 37°C のバッファー Y1 [50 mM HEPES (pH 6.6) / 140 mM NaCl / 3 mM MgCl₂] にて洗浄された後、氷冷したバッファー Y2 [バッファー Y1 に終濃度 10 μ g/ml のアプロチニンおよびロイペプチンを添加] 中に回収した。これより後の操作は全て氷上または 4°C 以下にて行い、暗下またはコダック No.2 セーフライトフィルター (コダック) 下の安全灯の下で行った。オプシン視物質再構成のため、COS1 細胞懸

濁液に終濃度 5 μM の 11-*cis*-レチナールを加え、水中にて 2 時間反応させた。再構成の後、細胞を可溶化バッファー[バッファーY2 に終濃度 1%のドデシルマルトシドおよび終濃度 20%のグリセロールを添加]に懸濁し、視物質を可溶化させた。上清を 1D4 抗体固相化セファロース (Molday and MacKenzie 1983) に終夜反応させて可溶化視物質を吸着させた。1D4 セファロースに吸着させた視物質を洗浄バッファー2[バッファーY2 に終濃度 0.1%のドデシルマルトシドおよび終濃度 20%のグリセロールを添加]と洗浄バッファー1[洗浄バッファー2 からアプロチニンおよびロイペプチンを除いたもの]で洗浄した。洗浄バッファー1 に終濃度 40mM の合成ペプチド I (ウシロドプシンの C 末端 15 アミノ酸) を加えた溶出バッファーを用いてセファロースから視物質を溶出させた。視物質溶液を Amicon Ultra-4 centrifugal filter unit with Ultracal-30 membrane (ミリポア) を用いて濃縮した。

LWS、RH2-C、SWS1 および SWS2B について、10 または 15 枚分の 10 cm 培養皿 (約 $5\text{-}6 \times 10^6$ 細胞) に培養した COS1 細胞に、1 枚当たり 7.5 μg の発現コンストラクト DNA を導入した。細胞導入には X-treme GENE HP DNA transfection reagent (ロシュ・ダイアグノスティクス) を用いた。再構成、可溶化、精製に関する工程は先述の RH2-B、SWS2A、RH1 と同様に行った。濃縮には Amicon Ultra-0.5 centrifugal filter unit with Ultracel-30 membrane (ミリポア) を用いた。LWS および RH2-C に関しては、視物質の劣化を避ける為に、可溶化、精製、濃縮の工程における処理時間を SWS1 および SWS2B よりも短縮した。

濃縮後の視物質について、250~650 nm の紫外部から可視波長域までの吸光スペクトルを 0.5 nm 刻みに測定した。RH2-B、SWS2A および RH1 の測定には U-3000 デュアルビーム吸光光度計 (日立工機) を、LWS、RH2-C、SWS2B および SWS1 の測定には Cary 60 UV-Vis 吸光光度計 (アジレント・テクノロジー) を用いた。測定は暗条件下で 5 回を行い、その後に明条件下 (LWS、RH2-B、RH2-C、SWS2A、SWS2B および RH1) また

は酸による異性化後（SWS1）に 5 回測定した。明条件下の光異性化には 25 W の白熱燈光に 1 分間露光を行った。酸による異性化には終濃度 1M の硫酸を添加した。

1. 2. 7 オプシン遺伝子発現量の定量

オプシン mRNA 測定の検量線作成のため、1.2.3 節にて述べた各オプシンの全翻訳配列 cDNA クローン DNA から標準 RNA の *in vitro* 合成を行った。各オプシンクローン DNA の挿入部位 3' 下流の *Sal*I 配列にて制限酵素処理を行い、MAXIscript T7 kit (Ambion) を用いて RNA の *in vitro* 合成を行った。合成 RNA はフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿にて精製した。精製 RNA の吸光度を測定し濃度を計算し、希釈系列を作製して標準サンプルとした。

定量的 RT-PCR (qRT-PCR) は OneStep RT-PCR kit (タカラバイオ) を用いて反応させ、ABI StepOnePlus real-time PCR system (アプライドバイオシステムズ) にて計測した。qRT-PCR に使用したプライマーおよび TaqMan プローブ (表 1-2) は Primer Express (アプライドバイオサイエンス) を用いて設計した。PCR 反応液 (10 μ l) の組成は以下の通りで行った: 1 \times QIAGEN OneStep RT-PCR buffer、1 \times QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme mix、400 μ M dNTP mix、1 ng の眼球 total RNA、2.5 pM の forward および reverse primer、2.5 pM の TaqMan プローブ。PCR 反応の設定は以下の通りで行った: 逆転写反応 [50 $^{\circ}$ C 30 分] \rightarrow HotStarTaq ポリメラーゼの活性化 [95 $^{\circ}$ C 15 分] \rightarrow PCR [94 $^{\circ}$ C 20 秒、60-65 $^{\circ}$ C 20 秒、72 $^{\circ}$ C 20 秒] \times 60 サイクル。眼球 total RNA 中のオプシン mRNA 量は *in vitro* 合成した標準 RNA の検量線 (10 ag、100 ag、1 fg、10 fg および 100 fg) から算出した。mRNA 量は先行研究 (Kobayashi et al. 2009) に従い 1 ng の眼球 total RNA あたりのコピー数として算出した。

1. 2. 8 統計処理

全てのデータは平均値±標準偏差の表記とした。3 か月、15 か月、27 ヶ月齢個体におけるオプシン mRNA 発現量の統計解析には分散分析 (one-way ANOVA) と Games-Howell 比較検定を行い、有意水準を 5% として検定した。統計計算には StatView (SAS Institute) を用いた。

1.3 結果

1.3.1 マツカワ視覚オプシンレパートリーの解明

マツカワ眼球 cDNA より 7 種の視覚オプシン遺伝子 (LWS、RH2-B、RH2-C、SWS1、SWS2A、SWS2B、RH1) を得た。また、ゲノム DNA より RH2-A を得た。得られた DNA 配列から類推されたアミノ酸配列を用いて系統関係を解析した (図 1-1)。RH2-A の DNA 配列の中では、エクソン 1 の 93 番目にナンセンス変異が入ることによって終止コドンが生じており、RH2-A が偽遺伝子であると考えられた (図 1-2)。また、このナンセンス変異はランダムに選択した 6 匹のマツカワゲノム DNA においても認められたため、多型的な変異ではないと考えられた。

サザンブロット解析では LWS、SWS1、SWS2A、SWS2B および RH1 のプローブによるハイブリダイゼーションの結果、異なる制限酵素処理をしたサンプルで全て単一のシグナルが得られた (図 1-3)。RH2-A に関しては、*Eco* RI および *Sal* I 処理では明瞭なシグナルが検出されなかったものの、*Pst* I 処理では単一のバンドが検出された。RH2-B および RH2-C では、3 種の制限酵素処理によって各々 2 つずつのバンドが検出された。同一の制限酵素処理の場合は RH2-B および RH2-C の間で同じサイズのバンドが検出され、シグナル強度は RH2-B と RH2-C の間で強弱が逆転していた。プローブに用いた領域の RH2-B と RH2-C 間の核酸配列の同一率は 86.8% であった。ハイブリダイゼーションの条件が 20% ミスマッチ程度を許容しうることから、両ブロットにおいて共に 2 バンドが検出されるのは RH2-B および RH2-C が各々クロスハイブリダイズした結果であ

ると推測された。以上より、マツカワの視覚オプシンを全てクローニングしたと結論付けた。

1.3.2 マツカワ視覚オプシンの吸光スペクトル

再構成実験に供したマツカワオプシンの吸収スペクトルにおいて、タンパク質に一般的な吸収極大である 280 nm 付近以外のピークが認められた (図 1-4)。SWS1 以外のオプシンにおいて、それらの非タンパク質由来ピークは、白熱灯による光異性化によって 380 nm 付近にシフトし、「暗条件-明条件」の差スペクトルにおいて負のピークとして検出された (図 1-4 における挿入図)。これは、オプシン-レチナール複合体における 11-*cis* レチナールが光異性化により *all-trans* レチナールへと変化し解離したことによるピークであると考えられる。SWS1 オプシンの場合、暗条件におけるピークは 367 nm であり、解離レチナールのピークに近すぎるため、UV 光への感受性の確認は硫酸による化学的異性化により行った。硫酸処理後のピークは 440 nm にシフトしたが、これはシッフ塩基がプロトン化された変性オプシン-レチナール複合体に由来するピークであると考えられる (Chinen et al. 2003)。LWS および RH2-C 以外のオプシンについては、 λ_{\max} の値は暗条件スペクトルから直接採用した。LWS および RH2-C は暗条件-明条件の差スペクトルから採用した (図 1-4)。各オプシンの λ_{\max} 値は以下の通りであった ; LWS: 552 nm、RH2-B: 506 nm、RH2-C: 489 nm、SWS2A: 482 nm、SWS2B: 416 nm、SWS1: 367 nm、RH1: 494 nm。SWS2A の λ_{\max} は 482 nm であったが、これは過去に測定された SWS2 オプシンの中で最も長波長感受性であり (図 1-1)、これまで知られていた最も長波長感受性であったイモリの SWS2 オプシン (474 nm、Takahashi and Ebrey 2003) よりも長波長感受性である。

1.3.3 成長に伴うマツカワオプシン遺伝子の発現変動

受精後3か月～15か月～27ヶ月齢のマツカワ眼球において比較した結果、LWS、RH2-C、SWS1 および SWS2B の mRNA 発現量は成長に伴い顕著に減少した (図 1-5)。RH2-B および SWS2A の発現量には変動が見られなかった。RH1 の発現量は顕著に増加した。各錐体オプシン mRNA の発現量には相当な差が見られた。例えば、3ヶ月齢における SWS1 mRNA の発現量 (10^5 - 10^6 copies/ng total RNA) は LWS、RH2-B および SWS2A の 10 倍以上であり、RH2-C および SWS2B の 1000 倍以上であった (図 1-5)。

1.4 考察

1.4.1 マツカワにおけるオプシンと生理機能および生活史の関連

マツカワの生理的状态に光環境が与える影響を検討するために、本研究では6種の錐体オプシンおよび1種の桿体オプシンのクローニングを行った。5タイプの視覚オプシンのうち SWS2 は2つのサブタイプ (SWS2A および SWS2B) に、また RH2 は3つのサブタイプ (RH2-A、RH2-B および RH2-C) に重複をしていた。

筆者の研究グループはこれまでに、カラーフィルター透過蛍光灯を用いてマツカワの飼育を行ってきた。その結果、青色フィルター光 (ピーク波長 446 nm) または緑色フィルター光 (ピーク波長 555 nm) 照射下では赤色フィルター光 (ピーク波長 622 nm) 照射下よりも成長が亢進した (Yamanome et al. 2009)。マツカワ錐体オプシンの λ_{\max} は LWS が 552 nm、RH2-B が 506 nm、RH2-C が 496 nm、SWS2A が 482 nm、SWS2B が 416 nm、SWS1 が 367 nm だった。よって、LWS は赤色フィルター光に辛うじて反応しうる一方で、LWS、RH2-B、RH2-C および SWS2A は緑色フィルター光に反応を、青色フィルター光には RH2-B、RH2-C、SWS2A および SWS2B が反応すると考えられる (図 1-6)。したがって、青色または緑色光による成長促進効果は主に RH2-B、RH2-C および SWS2A によって媒介されたものと推測される。RH1 の λ_{\max} の値は 494 nm であるため、青色または緑色光を受容する。しかし、RH1 は桿体型オプシンであり、成長促進効果のあった

緑色光照射の条件 ($1-10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{m}^{-1}$ 程度) では網膜が明順応しているために機能していないと考えられるため、成長促進効果には関連しないと考えられる。

成長に伴ってマツカワの波長感受性が変化する可能性が示されたが、この事には生息域環境の差異が関与している可能性が考えられる。マツカワをはじめとしたカレイ目の種には、発生初期の仔魚期には太陽光が豊富な浅瀬に生息し、成長とともに光量の少ない水底に移動するものが多い (Haug 1990, Andoh et al. 1999)。定量 RT-PCR の結果、RH2-B および SWS2A の mRNA 発現量には成長に伴う変化は見られなかった一方、他の錐体オプシン遺伝子 (LWS、RH2-C、SWS2B、SWS1) の mRNA 発現量は減少し、桿体オプシン RH1 の発現量は増加することが分かった。水中の光量は水深と共に減衰するため、薄明視に機能する RH1 オプシンの発現量増加が、水深が増すほどに増加することは環境変化に対して適応的である。水中では水深が増すほどに、長波長の光は吸収され、短波長の光はレイリー散乱の影響を受けるため、中波長 (緑色) 域の波長が相対的に豊富な光環境になる (Dartnall 1975)。実際に太平洋において、深度事に海水中の光照度を測定が行われており、その結果、500 nm 程度の波長の光が最もよく透過することが示されている (図 1-7)。よって、長波長域感受性 (LWS) や短波長感受性 (SWS2B および SWS1) のオプシン mRNA 発現量が成長に伴って減少することもまた環境光への適応と考えることができる。例外的に中波長域感受性の RH2-C は成長に伴って減衰するが、これは感受性が類似する他のオプシン (RH2-B および SWS2A) が存在することによって重要性が減じている可能性が考えられる。

1.4.2 RH2-A の偽遺伝子化と SWS2A の長波長感受性化の関連

マツカワ RH2-A オプシンは第 93 塩基の変異により偽遺伝子化している (図 1-2)。第 93 塩基以外にはナンセンス変異が存在しないこと、1 塩基の挿入や欠失によるフレームシフト変異が見当たらないこと、マツカワ RH2-B および RH2-C とアミノ酸比較におい

て 77.5% および 77.9% の相同性を保持していること（表 1-3）などから、RH2-A の偽遺伝子化は比較的最近におきた事象であると推測される。オプシン遺伝子の偽遺伝子化は他の魚種でもみられる。例えばフグの RH2-2 はトランスポゾン挿入により偽遺伝子化しており（Neafsey and Hartl 2005）、デメエソの SWS1 は挿入とナンセンス変異により偽遺伝子化し（Yokoyama et al. 2014）、またヤツメウナギの SWS1 および SWS2 は数多くのフレームシフトにより偽遺伝子化している（Davies et al. 2009）。Yokoyama et al. 2014 により、デメエソの SWS1 偽遺伝子は mRNA として発現するうえに塩基置換率が低く、RNA として何らかの機能を保持している可能性があることが報告されている。しかし、マツカワ RH2-A においては mRNA の発現は確認されなかったため、機能を失った偽遺伝子として存在している可能性が高い。

RH2-A の偽遺伝子化には SWS2A の極端な長波長感受性化が関連している可能性がある。棘鱗魚類において、RH2-A は RH2 の中では他のサブタイプ（約 490-530 nm）よりも短波長感受性（450-480 nm）である一方、SWS2A（約 430-460 nm）は SWS2B（約 400-430 nm）よりも長波長感受性であることが知られている（Matsumoto et al. 2006, Spady et al. 2006）。他の脊椎動物における SWS2 の λ_{\max} もこれら SWS2A および SWS2B を足し合わせた吸収波長域（約 400-460 nm）の範囲に収まる（Chinen et al. 2003, Yokoyama and Tada 2003, Bowmaker 2008）。イモリの SWS2（474 nm）はこの範囲に収まらないため数少ない例外だと考えられていた（Takahashi and Ebrey 2003, Chinen et al. 2005）。本研究において決定されたマツカワ SWS2A の λ_{\max} は 482 nm であり、過去最長の λ_{\max} を示したことになる。点変異導入による人為的なアミノ酸置換による研究の結果、イモリの SWS2 では、Pro91Ser（-10 nm : λ_{\max} が 10 nm 短波長に変化）、Ser94Ala（-14 nm）、Ile122Met（-6 nm）および Ala292Ser（-8 nm）のアミノ酸置換が λ_{\max} にほぼ相加的な効果を示すことが報告されている（Takahashi and Ebrey 2003）。マツカワの SWS2A においては、他の棘鱗魚類では 94 番目のアミノ酸残基は Ala のところが Gly である。Ala と

Gly の生化学的な性質は類似しているため、94 番目のアミノ酸置換が長波長化の主な原因である可能性は低い。長波長感受性化への大きな変化は、それぞれの効果は小さいものの、相加的あるいは相乗的に効果を持つ多くのアミノ酸置換によって実現した可能性もある。キングヨとゼブラフィッシュの SWS2 の λ_{\max} 比較の結果、単体では小さな効果しか持たなかったアミノ酸置換が、複数が同時に置換することによって合計よりも大きな効果を示した知見もある (Chinen et al. 2005)。起源が新しいと考えられる RH2-A の偽遺伝子化と合わせると、SWS2A が RH2-A の機能を代替した可能性が考えられる。

【第二章：マツカワ属における SWS2A オプシンの長波長化と RH2-A 機能消失】

2.1 背景

カレイ目の魚類には成長を通じて生息域を変化させる種が多い (Andoh et al. 1999)。カレイ類の多くは仔魚～稚魚期には海水面表層付近に生息するが、成長に伴い着底し、より深層に生息地を変える。また、カレイの色覚視システムは変態にも密接に関連すると考えられる。Winter flounder において、変態前仔魚の網膜では RH2 オプシンのみが発現するが、その他の LWS、SWS2、SWS1、RH1 の各オプシンは変態後に発現が確認されるという知見がある (Evans et al. 1993, Hoke et al. 2006, Mader and Cameron 2004)。

第一章において述べたように、筆者らはカレイ目カレイ科に属する大型冷水性カレイであるマツカワの視覚オプシンについての単離と機能解析を行った (Kasagi et al. 2015)。マツカワには脊椎動物に広範に認められる 5 タイプ (LWS、RH2、SWS2、SWS1 および RH1) のオプシン遺伝子の全てが存在する。それらの重複により生じた 7 遺伝子の機能的なオプシン遺伝子 (錐体オプシン 6 遺伝子と桿体オプシン 1 遺伝子) は全て網膜において発現していた。再構成実験によって測定されたマツカワ錐体オプシンの最大吸収波長 (λ_{\max}) は大部分が各オプシンのタイプとして妥当であり、RH2-B および RH2-C は緑色光感受性 (各 506 nm と 490 nm)、LWS は赤色光感受性 (552 nm)、SWS2B は青色感受性 (416 nm)、SWS1 は紫外線感受性 (367 nm) であった。

SWS2 オプシンは一般的に青色感受性のオプシンである。しかし、マツカワ SWS2A はアミノ酸配列上では青色感受性であるにも関わらず、機能的には緑色感受性オプシン (λ_{\max} : 482 nm) であった。その値は RH2-B (506 nm) や RH2-C (490 nm) の値に近く、SWS2B (416 nm) とは大きく異なる。一般的な硬骨魚類の SWS2A は 430-460 nm 程度に λ_{\max} をもつ (Matsumoto et al. 2006, Spady et al. 2006)。よって、マツカワの SWS2A では、マツカワの進化過程において長波長側に感受性が推移したものと考えられる。さら

に、7つの機能的なオプシン遺伝子の他に、マツカワには RH2-A 偽遺伝子が存在することを見出した。一般的な棘鱗上目 RH2-A の λ_{\max} は 450-480 nm 程度である (Matsumoto et al. 2006, Spady et al. 2006) ことを合わせて考えると、RH2-A の偽遺伝子化と SWS2A の長波長感受性化の間の関連性が想起される。

第一章で報告した通り、マツカワの6錐体オプシンのうち3オプシンは緑感受性である (SWS2A: 482 nm, RH2-C: 490 nm, RH2-B: 506 nm) ことから、マツカワの色覚は緑色光の波長解像度が優秀であると考えられた。これを受け第二章では、RH2-A の偽遺伝子化および SWS2A の長波長化という特徴がマツカワ特有のものか、あるいはカレイ目の魚種に広くみられる特徴なのかを検討するために、成魚が日本沿岸の様々な深度に生息する (Masuda et al. 1984) ホシガレイ (*Verasper variegatus*、カレイ科)、ババガレイ (*Microstomus achne*、カレイ科)、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*、ヒラメ科) の3魚種 (図 2-1) について視覚オプシン配列の決定と機能解析を行った。これらの種間で比較を行うことにより、SWS2A と RH2-A の分子進化についての系統進化学的かつ生態学的な検討が行えるものと考えたためである。

2.2 材料と方法

2.2.1 実験に供したカレイ目魚種試料

ホシガレイおよびババガレイの成魚については、仙台湾にて漁獲され水産研究教育機構・東北区水産研究所塩釜支所にて飼育された個体を用いた。ヒラメの成魚は、神奈川県水産技術センターにて飼育されたものを用いた。ホシガレイ、ババガレイおよびヒラメの平均体重はそれぞれ 382.8 g、175.0 g および 144.5 g であった。サンプル個体は「北里大学における動物実験等に関する規程」に従って処置をした。解剖に先立ってサンプル個体は 0.05 % の 2-フェノキシエタノール処理により麻酔し、眼球および筋肉組織は速やかに -80°C にて凍結保存を行った。

2.2.2 核酸の抽出および増幅

1.2.2と同様に眼球からの total RNA の抽出および精製を行い、筋肉組織からゲノム DNA を抽出し精製した。眼球 total RNA からの RT-PCR およびゲノム DNA からの PCR は 1.2.2 と同様に行った。

2.2.3 オプシンの cDNA またはゲノム DNA 断片クローニング

RH2-A 以外のオプシン遺伝子については、眼球 total RNA より逆転写を行い作製した 1st strand cDNA より全翻訳領域を含む範囲を増幅した。プライマーにはマツカワの全翻訳領域増幅用プライマーを用いた (表 1-1)。ババガレイ RH2-A については、「internal forward」プライマーおよび「internal reverse」プライマー (マツカワ RH2-A より設計、表 2-1) を用いて部分断片をゲノム DNA より増幅した。その後、上流および下流の配列を、「inverse forward」プライマーおよび「inverse reverse」プライマー (表 2-1) を用いて inverse PCR にて増幅した。その後全翻訳領域を含むプライマーにてゲノム DNA から増幅し (表 2-1)、pGEM-T ベクターを用いてクローニングを行った。クローニングに関する詳細および DNA シーケンシングについては 1.2.2 および 1.2.3 と同様に行った。

2.2.4 サザンブロット解析

ハイブリダイゼーションプローブにマツカワ RH2-A または RH2-B のエクソン 1 領域の cDNA 断片 (1.2.5 参照) を用いた。サンプル DNA にはホシガレイまたはババガレイのゲノム DNA を用い (10 μ g/レーン)、*Eco*RI、*Pst*I、あるいは *Sac*I 処理の後に 0.7% アガロースゲルにて電気泳動を行った。DNA ブロットティング、ハイブリダイゼーション、洗浄およびシグナル検出については 1.2.5 と同様に行った。

2.2.5 系統解析

マツカワ、ホシガレイ、ババガレイおよびヒラメ間のオプシン遺伝子の系統解析を行った。マツカワオプシン（第一章、GenBank accession numbers : LWS: AB930175、RH2-B: AB930177、RH2-C: AB930178、SWS1: AB930179、SWS2A: AB930180、SWS2B: AB930181、RH1: 930176）、本章で明らかになった他3種のオプシン（ホシガレイ : LWS: LC209595、RH2-B: LC209601、RH2-C: LC209604、SWS2A: LC209609、SWS2B: LC209612、SWS1: LC209598、RH1: LC209606、ババガレイ : LWS: LC209596、RH2-A: LC209814、RH2-B: LC209602、SWS2A: LC209610、SWS2B: LC209613、SWS1: LC209599、RH1: LC209607、ヒラメ : LWS: LC209597、RH2-A1: LC209812、RH2-A2: LC209813、RH2-B: LC209603、RH2-C: LC209605、SWS2A: LC209611、SWS2B: LC209614、SWS1: LC209600、RH1: LC209608）および外群としてゼブラフィッシュのVAオプシン（NM_131586）を含めた系統樹をMEGA5ソフトウェア（Tamura et al. 2011）により作製した。塩基配列にもとづく遺伝的距離をNei-Gojobori法（Nei and Gojobori 1986）により同義置換と非同義置換別にそれぞれ求め、近隣結合法（Saitou and Nei 1987）により樹形を求めた。樹形の信頼性は500回のブートストラップ計算により求めた。

2.2.6 カレイ目オプシン cDNA のアミノ酸配列比較

マツカワ、ホシガレイ、ババガレイおよびヒラメのLWS、RH2、SWS2、SWS1およびRH1について、波長調節アミノ酸残基とされているアミノ酸を比較した。波長調節アミノ酸については先行研究を参考にした（Nakamura et al. 2013）。SWS2Aについての結果を表2-5に示す。その他の遺伝子についての結果は、種間で波長調節アミノ酸配列の差異がなかったために割愛した。

2.2.7 最尤法を用いたオプシンのdN/dS比較

dN/dS 比 ($=\omega$ 、非同義置換率/同義置換率比) は選択圧/機能的制約の指標として用いられる指数である。カレイ目の各オプシン遺伝子における ω の値を PAML version 4.8 (Yang, 2007) および PAMLX version 1.3.1 (Xu and Yang 2013) 中の CODEML プログラムによって推定した。各オプシン cDNA 配列のアライメントを作製した後 (2.2.5)、形態学的な分類による系統関係 (Nelson 2006) にもとづき種間の系統関係を与えた。すなわち一般的には ([マツカワ、ホシガレイ]、ババガレイ、ヒラメ) であるが、RH2-A に関しては図 2-4 において求められた系統関係を採用し ([マツカワ、ヒラメ 1]、[ババガレイ、ヒラメ 2])、RH2-C に関してはババガレイ RH2-C が存在しないため (マツカワ、ホシガレイ、ヒラメ) とした。

各オプシン遺伝子について、以下 2 つのモデルにもとづいてそれぞれ ω の値を求めた。①: 全ての枝における ω が一定であるモデル (1ω モデル) および ②: 各々の枝における ω は様々な値をとってよいモデル (マルチ ω モデル) の 2 通りである。2 つのモデルの尤度を比較したとき、マルチ ω モデルの尤度が 1ω モデルの尤度よりも高かった場合、オプシン遺伝子の ω は枝によって異なり、不均一な進化をしていると推定できると考えた (Wang et al. 2011)。2 つのモデルにおける各々の尤度を比較するため、 χ^2 検定により 5% 水準での尤度比検定を行った。 1ω モデルにおけるパラメータ数は 7、マルチ ω モデルでは 11 であったので自由度は 4、RH2-C の場合は各々 5 および 7 であるため自由度は 2 となった。

SWS2A について、上記の枝モデル解析とは別にサイトモデルにもとづいた解析を行った。以下 2 つのモデルにもとづいてそれぞれの ω および尤度を求めた。①: 全てのコドンが、 $0 < \omega < 1$ の範囲の一樣な ω をもつモデル (PAML におけるモデル 7、機能制約を仮定したモデル) および ②: ①の場合と同じく基本的に $0 < \omega < 1$ の値をもつが、それとは別に $\omega > 1$ となるコドンを許可するモデル (PAML におけるモデル 8、ピンポイントに正の淘汰がかかっているコドンがありうる仮定) の 2 通りである。各々のモデルにおけ

る尤度を、枝モデルの場合と同様に χ^2 検定により 5%水準での尤度比検定を行った。モデル 7 の自由度は 3、モデル 8 の自由度は 5 であるため自由度 2 の χ^2 検定に従い検定した。

2.2.8 オプシン祖先配列の推定

SWS2A の祖先型アミノ酸配列は、JTT モデル (Jones et al. 1992) に基づいて最尤法により推定した。マツカワ、ホシガレイ、ババガレイおよびヒラメに加えて、以下の棘鱗上目魚種の SWS2A を外群として用いた [ナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*) : GenBank accession No.:JF262088、シクリッド (*Maylandia zebra*) : ADW80520、カダヤシ (*Lucania goodei*) : AY296737、メダカ (*Oryzias latipes*) : AB223056]。各節における祖先型のアミノ酸配列は、各アミノ酸残基において一番高い尤度で推定されたアミノ酸配列から構成した。祖先推定に必要な現生種の系統関係は、形態学的分類 (Nelson 2006) および分子遺伝学的分類 (Betancur and Orti 2014) から設定した。各アミノ酸サイトにおけるパラメータは一樣であると仮定した。計算には上記 8 アミノ酸配列を用い、MEGA5 (Tamura et al. 2011) を用いた。

2.2.9 視物質再構成による最大吸収波長測定

SWS2A の全翻訳配列を含む cDNA は pGEM-T ベクターのクローンより表 2-1 のプライマーを用いて PCR により増幅された。その後の DNA コンストラクト作製、COS-1 細胞への DNA 導入、視物質の精製と測定に関しては 1.2.6 節と同様に行った。

2.2.10 人工的点変異導入

マツカワ、ババガレイおよびヒラメ SWS2A の pMT5 ベクターコンストラクト DNA (2.2.9 参照) を鋳型として点変異を導入した。点変異導入に用いたプライマーの配列

を表 2-2 に示す。点変異導入反応は PrimeSTAR Max DNA polymerase (タカラバイオ) を用い、以下の熱反応に従った : 95°C 10 秒、[95°C 10 秒、59°C 10 秒、72°C 1 分] x 25 サイクル。サイクル反応の後、反応物を制限酵素 *Dpn I* (タカラバイオ) にて処理し、アガロース電気泳動精製 (1. 2. 2 参照) の後に大腸菌へ導入した。プラスミド DNA の抽出後に DNA シーケンシングを行い、期待した変異が導入されていることおよび期待しない変異が導入されていないことを確認した。

2. 3 結果

2. 3. 1 カレイ目魚種の視覚オプシンレパートリーおよび mRNA 発現の比較

ホシガレイ、ババガレイおよびヒラメにおいて、マツカワで見出された視覚オプシン遺伝子と相同な遺伝子が存在するかを検証するために、cDNA クローニングを行った。LWS、RH2-B または RH2-C、SWS2A、SWS2B、SWS1 および RH1 は 3 種全ての眼球 RNA から RT-PCR により増幅された (図 2-2A)。RH2-B と RH2-C は相同性が高く各遺伝子を独立に増幅することが難しかったため、両遺伝子を同時に増幅した後ダイレクトシーケンシングおよび cDNA クローンのシーケンシングにより判別を行った。ホシガレイおよびヒラメからは RH2-B および RH2-C に相当すると考えられる 2 種の配列が検出された。よって、これら 2 種では眼球において RH2-B および RH2-C が発現していると考えられた。一方で、ババガレイ眼球からは RH2-B に相当すると考えられた配列は増幅されたものの、RH2-C に相当する配列が検出されなかった。RH2-C が欠損している可能性についての検証は次段落にて詳述する。RH2-A の mRNA はいずれの種の眼球においても増幅されなかった (図 2-2A) が、ババガレイおよびヒラメのゲノム DNA からは、妥当な長さの翻訳領域を含み、挿入や欠損によるフレームシフト変異やナンセンス変異を含まない、5 エクソンおよび 4 イントロンからなる RH2-A ゲノム DNA 断片が増幅された (図 2-2B)。ヒラメにおいては新たな RH2-A 断片も増幅されたので、これを

RH2-1a および RH2-1b と名付けた (図 2-2B)。しかし、ホシガレイゲノム DNA からは RH2-A に相当する断片は増幅されなかった。以上を合わせた結果、ババガレイおよびヒラメにおいては成魚眼球における RH2-A の発現は非常に少量であるか皆無であり、ホシガレイにおいては RH2-A 遺伝子が欠損しており、その他のオプシン遺伝子は全て成魚眼球にて発現していると考えられた (表 2-3)。

ババガレイにおいて RH2-C が欠損している可能性を、サザンブロット解析により検証した。RH2-B および RH2-C の双方を持つホシガレイを比較対照とした。第一章と同様、マツカワ RH2-B および RH2-C のエクソン 1 に相当する部分をプローブとして用い、マツカワ同様に RH2-B および RH2-C の双方が検出される (マツカワにおける両者の塩基配列相同性は 86%) ように設計した。マツカワ RH2-B プローブ配列はホシガレイ RH2-B および RH2-C とそれぞれ 99% および 88% の相同性を示し、ババガレイの RH2-A および RH2-B とはそれぞれ 83% および 95% の相同性を示した。第一章において行ったサザンブロット解析では、20% ミスマッチ程度を許容する実験条件で行った (1. 2. 4 参照)。よって同条件であれば、マツカワ RH2-B プローブを用いればホシガレイにおいて RH2-B および RH2-C の双方を検出でき、ババガレイにおいては少なくとも RH2-B の検出が可能であると考えた。サザンブロット解析の結果、ホシガレイの DNA を制限酵素 *Eco* RI、*Pst* I、*Sac* I いずれで切断した場合においても 2 バンドの明瞭なシグナルが得られた (図 2-3A)。ホシガレイでは RH2-B と RH2-C の双方が RT-PCR により増幅されているため、これら 2 バンドのシグナルが RH2-B と RH2-C に相当すると考えられた。このホシガレイのサザンブロットをアルカリ処理によるリプローブを行い、マツカワの RH2-A エクソン 1 プローブを再度ハイブリダイズさせたところ、明瞭なシグナルは得られなかった。以上の事から、ホシガレイゲノム上には RH2-A が存在せず、RH2-B および RH2-C があるのみであると考えられた。ババガレイについて、マツカワ RH2-B プローブのハイブリダイズにより、いずれの制限酵素処理においても明瞭な単一バン

ドのシグナルが得られた (図 2-3B)。これは眼球にて発現が確認されている RH2-B に相当するものと考えられた。よって、ババガレイのゲノム上には RH2-A および RH2-B が存在するが、RH2-C は存在しないものと考えられた (表 2-3)。

2.3.2 カレイ目魚種の視覚オプシン配列比較

塩基配列を用い、近隣結合法にもとづいたオプシンの系統解析を行った (図 2-4)。同義置換 (dS: 中立的な変異の指標) および非同義置換 (dN: 非中立的な変異の指標) を用いた系統樹をそれぞれ計算し、カレイ目オプシン遺伝子の進化において同義置換および非同義置換が与えた影響を検討した。非同義置換の系統樹 (図 2-4A) において、RH2-A 以外の各オプシン遺伝子の系統関係は、一般に広く支持される種の系統関係 (図 2-1、Nelson 2006) と同一のトポロジーを示した。RH2-A に関しては、ヒラメにおける 2 種のサブタイプ (RH2-A1 および A2) がそれぞれマツカワとババガレイの RH2-A に高いアミノ酸同一率を示した。LWS、RH2-A、RH2-C、SWS2B および RH1 のトポロジーは同義置換 (図 2-4A) と非同義置換 (図 2-4B) の系統樹間で同一だったが、RH2-B、SWS2A および SWS1 のトポロジーは異なった。

カレイ目オプシン遺伝子の進化過程において機能的制約を量的に評価するため、最尤法を用いた枝モデル dN/dS (一般的に ω とおく) 比較を行った。各枝における ω が全て等しいという仮定 (1ω モデル、PAML software [Yang 2007] における "model 0") では、各オプシンの ω は 0.146-0.344 の範囲に推定された。一方、各枝における ω は異なっているという仮定 (マルチ ω モデル、PAML software における "model 2") では、各オプシンの各枝で ω は 0.075-1.19 の範囲で推定された (同義置換または非同義置換がない場合の $\omega=999$ 、 $\omega=0.0001$ を除く)。各オプシン遺伝子について、 1ω モデルおよびマルチ ω モデル間での尤度比の検定を行ったところ、SWS2A および SWS1 についてはマルチ ω モデルを有意に支持する結果となった。このことから、8 オプシン遺伝子のうち

SWS2A および SWS1 においては、いずれかの系統（の枝）において他の系統（枝）とは異なる進化が起きている可能性が示された。

2.3.3 視物質再構成によるカレイ目 SWS2A の機能解析

ホシガレイ、ババガレイおよびヒラメの SWS2A について再構成実験による最大吸収波長 (λ_{\max}) の測定を行い、マツカワと比較した。その結果、ホシガレイ SWS2A は 485.4 nm、ババガレイ SWS2A は 451.9 nm、ヒラメ SWS2A は 465.6 nm の λ_{\max} を示した (図 2-5)。マツカワ SWS2A (482.3 nm) と比較すると、ホシガレイ SWS2A はマツカワよりごくわずかに長波長な λ_{\max} を持ちマツカワとともに緑色光感受性である一方、ババガレイおよびヒラメの SWS2A は短波長よりの λ_{\max} を持ち青色感受性である。以上のことから、マツカワ属の SWS2A は一般的な青色感受性から長波長にシフトしていると考えられた。

マツカワ属 SWS2A の長波長感受性化における分子進化の過程を推測するため、最尤法の計算を用いて、4 種のカレイ目の祖先型アミノ酸配列を推定した。カレイ目の祖先型、カレイ科の祖先型、マツカワ属の祖先型の SWS2A アミノ酸配列を推定することにより、各系統において起こったアミノ酸置換を推定した (図 2-6)。マツカワ属の祖先型 SWS2A はマツカワ SWS2A のアミノ酸配列と同一と推定されたため、 λ_{\max} は 482.3 nm と推定された。

カレイ目祖先型およびカレイ科祖先型 SWS2A の λ_{\max} を求めるため、PCR を用いた人工点変異導入法により、カレイ目祖先型 SWS2A をコードする cDNA 配列をヒラメ SWS2A に 6 変異を導入して作出した。また、カレイ科祖先型 SWS2A をコードする cDNA 配列をマツカワ属祖先型 SWS2A (=マツカワ SWS2A) に 8 変異を導入して作出した。各々のカレイ目祖先型およびカレイ科祖先型 SWS2A を再構成実験に供したところ、各々の λ_{\max} は 465.4 nm および 462.4 nm であり (図 2-7) ともに青色光感受性であ

った。

SWS2A の青色光感受性から緑色光感受性へのシフトに大きな効果を担ったアミノ酸残基を推定する上で、275 番目の Ala→Thr 変異に着目した。このアミノ酸残基は最大吸収波長に変化を与えることが知られており (Yokoyama and Tada 2003, Yokoyama et al. 2007)、なおかつレチナールの周囲 5 オングストローム以内にある (Palczewski et al. 2000) アミノ酸残基と考えられるからである。さらに、マツカワ SWS2A およびホシガレイ SWS2A どちらにおいても 275Thr のコドン (ACC) は共通であることから、マツカワ属共通祖先で生じた塩基置換をマツカワとホシガレイが継承していると考えられたためである。カレイ科祖先型 SWS2A に 275Thr 変異を導入し再構成により λ_{\max} を測定したところ、462.4 nm から 479 nm へと長波長シフトが起こった。逆に、マツカワ属祖先型に 275Ala 変異を導入し λ_{\max} を測定したところ、482.3 nm から 469.6 nm へ短波長シフトが起こった (図 2-8)。

2.4 考察

2.4.1 カレイ目視覚オプシンの特徴

第一章におけるマツカワと本章におけるホシガレイ、ババガレイおよびヒラメの結果を合わせて、以下の 5 つの点がカレイ目のオプシンに特徴的であることが分かった。すなわち、①: 4 種全てにおいて LWS、RH2-B、SWS2A、SWS2B、SWS1 および RH1 がゲノム中に存在し、成魚眼球において mRNA が発現している ②: マツカワ、ホシガレイおよびヒラメは RH2-C を持つがババガレイには存在しない ③: マツカワ、ババガレイおよびヒラメは RH2-A をゲノム中に持つが mRNA は成魚眼球にて発現しない ④: ホシガレイは RH2-A を持たない ⑤ヒラメは RH2-A を 2 遺伝子持つものの、双方とも成魚眼球において mRNA 発現はみられない という特徴である。②~⑤の特徴をまとめれば、「カレイ目全体において RH2-A の重要性は低く、ババガレイでは RH2-C の重要

性も低い。一方で他のオプシン遺伝子は機能的に正常かつ発現している」と言える。

各オプシンのアミノ酸配列を比較した結果、既知の波長調節アミノ酸残基に種差が認められたのは **SWS2A** のみであった。実際に再構成実験の結果、**SWS2A** はマツカワとホシガレイにおいては緑色光感受性であり、ババガレイとヒラメでは青色光感受性であった。さらに詳細を検討した結果、マツカワ属の共通祖先系統に起こったであろう、長波長化を引き起こしたアミノ酸置換を推定するに至った。

2.4.2 RH2 サブタイプの進化

ババガレイおよびヒラメの **RH2-A** の被翻訳領域にはナンセンス変異が存在しない。よって、これらの種の成魚眼球において **RH2-A** の発現が認められないのは発現量が極端に少ないことに起因する可能性がある。マツカワにおいて **RH2-A** は一か所のナンセンス変異により偽遺伝子化しているものの、それ以外の挿入または欠失やナンセンス変異はない。また、一か所のナンセンス変異以外のアミノ酸配列はよく保存されている(図 1-2)。よって、マツカワ **RH2-A** を偽遺伝子と化したナンセンス変異は比較的近年に起きたイベントであると考えられ、①マツカワ属祖先からマツカワの祖先が分岐した後に起きた、もしくは②マツカワ属の祖先がババガレイらの祖先と分岐した後に起きた可能性が考えられる。(図 2-9)。ホシガレイにおいては **RH2-A** が存在することを示す証左はサザンブロット解析からもゲノム PCR からも得られなかった。ホシガレイ以外の3種、とくに同属のマツカワには **RH2-A** がゲノム上に存在することから、ホシガレイ **RH2-A** が消失したのはマツカワ属の祖先からホシガレイ祖先が分岐した後の事象であると考えられる。したがって、①マツカワにおける **RH2-A** の偽遺伝子化とホシガレイの **RH2-A** 遺伝子消失はそれぞれの系統において独立に生じた現象であるか、②マツカワ属の祖先において偽遺伝子化が起き、種分化後にホシガレイ系統で遺伝子消失が起きたかのいずれかと考えられる(図 2-9)。総合して考えると、成魚眼球において **RH2-A** の発現量

がないか極端に少ないことはカレイ目に共通の特徴であり、眼球における RH2-A の重要性が減じていることが共通の進化的特徴であると示唆される。

RH2-C はマツカワ、ホシガレイおよびヒラメにおいて検出されたものの、ババガレイではサザンプロット解析とゲノム PCR の双方において検出されなかった。RH2-A と同様に系統関係を考察すれば、この RH2-C の消失はカレイ科祖先からババガレイ祖先が分岐した後の事象であると考えられる。本研究で扱った 4 種を比較する限り、カレイ目においてどの種でも常に機能していると考えられるのは RH2-B のみである。少なくとも成魚眼球においては、カレイ目に 3 種類の RH2 サブタイプが全て発現することは必ずしも必要ではない可能性が推測される。

2. 4. 3 SWS2A の分子進化

SWS2A 遺伝子は元来、一般的な魚種では、青色感受性のオプシンである ($\lambda_{\max} = 430\text{-}460\text{ nm}$ 程度)。本研究においてもババガレイ (451.9 nm) やヒラメ (465.6 nm) では青色光感受性であったが、マツカワ属では緑色光感受性であった (マツカワ : 482 nm、ホシガレイ : 485 nm)。このことからマツカワ属の共通祖先において青色光感受性から緑色光感受性へのシフトが起きたと推測された (図 2-9)。人工点変異導入を行いカレイ科の共通祖先型配列からマツカワ属の共通祖先型配列への進化過程を検討した結果、カレイ科祖先型 SWS2A からマツカワ属祖先型 SWS2A への長波長化は 19.9 nm であり、2 遺伝子間の 8 変異のうち Ala275Thr 変異は単体で 16.6 nm の効果をもつため、マツカワ属 SWS2A の長波長化には Ala275Thr が主に効果があったと考えられた (表 2-6)。この変異の効果は、青色光感受性のババガレイ、ヒラメ、カレイ目共通祖先の配列およびカレイ科共通祖先配列においても 275 番目残基が Ala であり、緑色光感受性のマツカワおよびホシガレイでは Thr であることから支持される。その他のアミノ酸置換にも効果はあるが、全ての効果を足しあわせても 275Thr 置換の効果より小さい (表 2-6)。よって、

表 2-5 に示す様々な波長調節残基のうち、ことマツカワ属の長波長化に関しては 275 番目の置換が大きく寄与したと考えられる。

マツカワとホシガレイの SWS2A を緑色光感受性に変化させた 275Thr 突然変異が、マツカワ属の共通祖先で起きた一度のイベントであったことは、2 種間で 275Thr のコドンが共通している (ACC) ことから明らかである。また 275Thr 変異がカレイ科の共通祖先からマツカワ属の共通祖先に至る過程で起こったことは祖先系推定から支持されている (図 2-6)。枝モデルにおける SWS2A の系統間比較において、 ω の値は 1 ω モデル (0.344) とマルチ ω モデル (0.194 - 0.658) の双方で常に 1 よりも低く、配列全体に対して機能的制約が恒常的に掛かり続けていたことを示唆する (表 2-4)。以上を合わせて考えると、①Ala275Thr 変異の効果が大きかったこと、②それゆえにマツカワ SWS2A の長波長化が急激なイベントであったこと、③主に 1 アミノ酸置換の効果によるイベントゆえに ω に反映されなかったこと、が想定される。

③の可能性を検討するために、SWS2A のいずれかのアミノ酸/コドンに正の淘汰を検出が出来ないかをサイトモデルに従って検討した (表 2-7)。機能制約を想定したモデル 7 に従った場合の尤度と正の淘汰がかかっているアミノ酸/コドンが存在する仮定のモデル 8 に従った場合の尤度を比較したところ、統計的に優位な差は認められなかった。よって、SWS2A のいずれかのアミノ酸/コドンに $\omega > 1$ となる正の淘汰は認められなかった。モデル 8 において $\omega > 1$ と推定されたサイトは 275 番目ではなく 106 番目であった。この 106 番目のアミノ酸は、マツカワで Cys、ホシガレイで Phe、ババガレイで Val、ヒラメで Ala と 4 種全てで異なっており、そのため「各系統で分化している」と検出されたと考えられる。実際のこのアミノ酸の λ_{\max} への効果は不明であるが、マツカワ属祖先とホシガレイ (各々 482 および 485 nm) およびカレイ目祖先とヒラメ (各々 465 および 466 nm) のアミノ酸の違いに含まれている (図 2-6) ため、A275T 変異のように飛び抜けて大きな効果をもつとは考えにくい。よって、前段落で述べた③の通り、1 アミ

ノ酸置換の効果を検出することはサイトモデルでも困難であると考えられた。

2.4.4 カレイ目の視覚機能と生態との関連

硬骨魚において RH2 オプシンと SWS2 オプシンは、LWS オプシンや SWS1 オプシンと比較して、遺伝子数が種ごとに多様であり相同遺伝子間の遺伝的距離が長いという報告がある (Gojobori and Innan 2009)。これらの多様性は、遺伝子に対する淘汰圧がオプシン間で異なっている可能性で説明される。LWS や SWS1 はそれぞれ可視域の最も長波長側 (赤 : LWS) と最も短波長側 (紫外線 : SWS1) を分担するオプシンであるがゆえに、可視域を狭めないように高い淘汰圧下にあると考えられる。一方で RH2 や SWS2 は中間的な波長域を担うがゆえに低い淘汰圧下にあると考えられるため機能的に様々な変化が可能であり、各々の種の生態に適応的な分子進化を可能にしていると考えられる。

マツカワ属における緑色光感受性オプシンについても生態と関連している可能性が考えられる。一般的にカレイの成魚は産卵に際して沖から岸に、深度の深い水底から浅瀬へと移動する。孵化後、カレイ仔魚は左右対称の姿で岸辺の表層を浮遊する。左右非対称に変態した後、稚魚は浅瀬の水底に移動し着底する。成長が進むにつれ稚魚はより沖の深い水底へ移動する (Minami and Tanaka 1992, Münzing 1968, Wada et al. 2006)。水底では太陽光の光量は減衰し波長成分は海水の組成によりさまざまに変化する。一般的に、透明で有機物の少ない海水中では、太陽光のうち長波長光は吸収により減衰し、短波長光はレイリー散乱により減衰する。つまりカレイの生息域が深くなるほど、中波長の、緑色の光が相対的に環境中に増える (Levine and MacNichol 1982、表 2-7)。すなわちマツカワ属の緑色光感受性オプシンレパートリーが独特なのは、緑色光が相対的に豊富な水底の光環境への適応の結果と考えられる。

マツカワ属においては RH2-A の偽遺伝子化または遺伝子消失と SWS2A の長波長化

が認められる。前節において考察した通り、RH2-A における偽遺伝子化と遺伝子消失の順序については不定である (図 2-9)。それぞれの場合を想定すると、①偽遺伝子化と遺伝子消失が独立だった場合、SWS2A の長波長化が先んじて起きたイベントであると考えられる。逆に②偽遺伝子化が共通のイベントであり遺伝子消失が後に起きたと考えると、SWS2A の長波長化と RH2-A 偽遺伝子化がマツカワ属祖先において近い時期に起きたイベントであると考えられる。重複遺伝子の誕生～分化～定着を説明する DDC モデル (Force et al. 1999) によれば、誕生したての重複遺伝子は機能が同一であり、その後は A: 2 つは不要であるためどちらかが消失する、または B: 2 つの遺伝子が元々の機能を分担するようになる、または C: どちらかが新規の機能を獲得する、のいずれかの道をたどると述べられている。このモデルをマツカワ属 RH2-A と SWS2A に当てはめて考察する。すなわち前述の①および②の想定で SWS2A の長波長化が先に起きた場合、「偶発的に似たような λ_{\max} になった RH2-A と SWS2A」を「重複によって生まれた 2 遺伝子」と同等とする。DDC モデルで説明するならば、機能が重複しているこれら 2 遺伝子のうちどちらかが (現実としては RH2-A が) 消失 (現実としては偽遺伝子化) を起こして、更にホシガレイ系統で消失した、と考えることができる。すなわち、遺伝子座を越えて重複遺伝子間で偶発的な生き残り消失が起きたと考えられる稀なケースであると想定できる。②の想定のうち、RH2-A の偽遺伝子化が先に起き、後に SWS2A が長波長化したと想定する場合、端的に RH2-A の機能を SWS2A の長波長化が補填したと考えることができる。よってこの場合では「緑色光感受性を担うオプシンが遺伝子座を越えて機能的代替を起こした」と考えられる。この場合、SWS2A が青色感受性であるよりも緑色感受性である方が視覚全体として有利な点があったと考えられ、緑色光感受性を維持することの有利性が示唆される。例えば緑色光の豊富な水底への環境適応などを想定することが可能なため、具体的な光環境とオプシン進化の関連についての今後の研究課題として興味深いと考えられる。

【第三章：マツカワ非視覚オプシンの探索と発現解析および吸収波長解析】

3.1 背景

これまで第一章と第二章を通じてカレイ目の視覚オプシンについて構造と機能および分子進化に関して議論を進めてきた。これによりマツカワをはじめとするカレイ目が、視覚オプシンの分子進化の結果、様々な色覚能力を持つに至った過程を示してきた (Kasagi et al. 2018)。またこの色覚の特性が、緑色光照射による成長の亢進と関連がある可能性を示したが、必要条件である根拠は見出せていない。

脊椎動物には視覚以外の光受容機構が存在する。松果体は、ヒトでは発達した大脳に覆われているが、多くの脊椎動物では頭蓋骨の頭頂部近くに存在し直接光受容を行う。四足動物の松果体ではピノプシンと呼ばれるオプシンが発現し (Okano et al. 1994)、また魚類の松果体にはエクソロドプシンと呼ばれる RH1 オプシンのサブタイプにあたるオプシンが発現している (Mano et al. 1999)。これらのオプシンが、松果体の主機能である生物時計の光リセットの入力系を担っていると考えられている。松果体は光刺激による調整を受けつつ、概日リズムに同調し、夜間にメラトニンを分泌させる。これらの松果体オプシンを介した光受容および松果体内分泌系が緑色光照射による成長亢進と関連する可能性は否定できない。

また、特定の組織として独立していない光受容機構も多く存在する。Vertebrate Ancient オプシン (VA オプシン) と呼ばれるオプシンは、哺乳類以外の脊椎動物において網膜内の水平細胞やアマクリン細胞などの視細胞以外の細胞に発現する一方、松果体基底部の手綱核にも発現する (Fischer et al. 2013)。魚類において、松果体の付属器官である副松果体にはパラピノプシンが発現する (Blackshaw and Snyder 1997)。爬虫類の頭頂眼にはパリエトプシンが発現する (Su et al. 2006)。上記した視覚または非視覚オプシンは Gt 型 G タンパク質と共役するが、エンセファロプシンおよび TMT オプシンとよばれるオ

プシンは Gi 型や Go 型 G タンパクと共役し、さらに Gi 共役型の別オプシンであるニューロプシン、Gq 型 G タンパク質と共役するメラノプシンらが様々な臓器で発現する (Provencio et al. 1998)。これらをまとめて非視覚系オプシンと総称する。硬骨魚類は脊椎動物で知られる非視覚系オプシンの大部分をもち、一部のオプシンは哺乳類を含めた四足獣とは異なる組織で発現することもある (Kingston and Cronin 2016)。

これらの非視覚系オプシンがカレイ目における特定波長照射による成長促進作用を媒介する可能性は否定できない。そこで第三章では、マツカワにおいて非視覚系オプシンの単離を試みた。これらの機能解析を進め最大吸収波長を解明すれば、特定波長光照射効果を担うオプシンの候補であるかどうかを判明すると考えたためである。

3.2 材料と方法

3.2.1 マツカワ組織試料

実験に用いたマツカワは全て水産研究・教育機構、北海道区水産研究所厚岸庁舎から分与された。

全長 23 mm の受精後約 1 ヶ月齢仔魚 (性別未詳、変態後期 : G ステージ~完了期 : H ステージ、Aritaki et al. 2000) の 1 個体全身より total RNA を抽出し、RT-PCR に供した。RNA の抽出および DNase 処理等に関しては第一章 (1.2 節) と同様に行った。

受精後約 15 ヶ月齢個体 (第一章 1.2.1 節参照) より全脳、眼球、有眼側皮膚 (変態前は背側) および無眼側皮膚 (変態前は腹側) の各組織を切り出し、total RNA を抽出した後に RT-PCR に供した。RNA の抽出ならびに DNase 処理等については第一章 (1.2 節) と同様に行った。

3.2.2 核酸の抽出、RT-PCR および cDNA クローニング

仔魚全身サンプルからの RNA 抽出、精製、RT-PCR による増幅、ダイレクトシーケン

シング、RACE 法による 5' および 3' cDNA 配列増幅、cDNA クローニングなどは第一章と同様の方法で行った。仔魚全身 RNA からの部分 RT-PCR、RACE-PCR、全翻訳領域の RT-PCR に用いたプライマーを表 3-1 に示す。各オプシン cDNA 増幅用のプライマーはウシノシタ (*Cynoglossus semilaevis*)、ヒラメの配列情報を参考に設計した。系統解析に用いた多種の非視覚オプシンアミノ酸配列は以下の通りである；ゼブラフィッシュ (opn4.1: KT008429 、 opn4a: NM_001128761 、 opn4xb: NM_001258223 、 opn5: NM_001200046、VA: AB035277、VAL: NM_131586、parietopsin: AB693171、parapinopsin: NM_001005312、opn3: KT008413 および NM_001111164、ExRh: NM_131212)、メダカ (opn4 (var x1): XM_024297258、opn4 (var x2): XM_024297259、VAL: NM_001136515、opn3: NM_001305403、rho (ExRh): XM_024292420)、フグ (opn4: XM_003963765、opn5: XM_003977310 、 VA-like: XM_003963622 、 VA-like: XM_003967659 、 pinopsin-like: XM_003968127、Rho (ExRh): NM_001033849)、タイセイヨウオヒョウ (melanopsin 1: KF941289、VAL: KF941295、ExRh: KF941294)、ヒラメ (ExRh: XM_020096205)、ウシノシタ (melanopsin A: XM_008321406、opn5: XM_008337247、VA-like: XM_008322205、parapinopsin-like: XM_008312195 、 parapinopsin-like (parapinopsin): XM_017035661 、 pinopsin-like: XM_017031529、opn3: XM_008322160)、Summer flounder (*Paralichthys dentatus*、VAL: KU980169)、アユ (*Plecoglossus altivelis*、VA-L: AB074483、VA-M: AB074482)、ゾウギンザメ (*Callorhynchus milii*、opn4: NM_001292116、pinopsin-like: XM_007896544、pinopsin-like (tmt-like): XM_007885800)、タイセイヨウサケ (opn5: XM_014145229、rod-like (ExRh): NM_001123536)、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*、parapinopsin: NM_001124225)、ナイルティラピア (VA: XM_003458690、parapinopsin-like: XM_006782722)、スポテッドガー (*Lepisosteus oculatus*、VA-like: XM_006630393、parapinopsin-like: XM_006631127)、シーラカンス (*Latimeria chalumnae*、VA-like: XM_006003709、pinopsin-like: XM_005987543)、アフリカツメガエル (*Xenopus Laevis*、

VA: NM_001171892、parietopsin: NM_001045791、parapinopsin: BC171332)、グリーンア
ノール (*Anolis carolinensis*、VA: NM_001293118、VA (VA-like): XM_003221042、pinopsin-
like: XM_016997727、parapinopsin: NM_001293131)、ニワトリ (*Gallus gallus*、pinopsin:
U15762)、マウス (*Mus musculus*、encephalopsin: AF140241)、ラット (*Rattus norvegicus*、
Rho: NM_033441)、ヒト (*Homo sapiens*、encephalopsin: AF140242、Rho: NM_000539) お
よびショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*、Rh2: NM_079674、Rh3: NM_079687、
Rh4: KX802256、Rh5: U80667、Rh6: NM_079644、Rh7: NM_079311)。

3. 2. 3 組織発現解析

15 ヶ月齢魚の眼球、全脳、有眼側皮膚 (元背側) および無眼側皮膚 (元背側) またポ
ジティブコントロールとして1 ヶ月齢仔魚全身 RNA から、本研究にて明らかになった
マツカワ非視覚オプシンについて全翻訳配列を含むプライマー (表 3-1) とともに RT-
PCR を行った。各組織由来の RNA 10 μ g から One-step RT PCR kit (タカラバイオ) を
用いて RT-PCR を行い、1/4 量をアガロース電気泳動にて解析した。ポジティブコント
ロールとして β -アクチン増幅用プライマーを用いた (表 3-1)。

3. 2. 4 視物質再構成

第一章と同様に全ての非視覚オプシンについて発現ベクター pMT5 に再クローニング
して発現コンストラクトを作製した (プライマー一覧: 表 3-1)。マキシプレップによる
プラスミド大量精製、COS1 細胞への発現コンストラクト導入、視物質再構成、可溶化、
精製および測定は第一章と同様の手法により行った。ただし、暗状態スペクトルから λ_{\max}
が測定可能なほど収量は高くなかったため、全て「暗状態スペクトル – 明状態スペ
クトル」の差スペクトルから λ_{\max} を求めた。また、一部のオプシン (パラピノプシン 1
および 2、パリエトプシン、TMT オプシン) については精製前の可溶化上清の吸光を測

定し、差スペクトルから λ_{\max} を求めた。

3.3 結果

3.3.1 マツカワ非視覚オプシンのレパートリー解明

非視覚オプシンは様々な臓器での発現が予想されるため、マツカワ仔魚の全身 RNA を用いて非視覚オプシンの単離を試みた。対象とする遺伝子は GenBank に登録されているウシノシタの非視覚オプシン情報およびメダカやゼブラフィッシュなどのモデル魚種の情報を参考にした (3.2.2 節参照)。マツカワに存在が予測される非視覚オプシン (11-*cis* レチナール共役型オプシン) の cDNA 配列を RT-PCR および RACE 法を用いて決定した。その結果、マツカワには少なくともエクソロドプシン、VAL オプシン、パラピノプシン、パリエトプシン、TMT オプシン、エンセファロプシン (Opn3)、メラノプシン (Opn4) およびニューロプシン (Opn5) が存在することが分かった (図 3-1)。ウシノシタにおいてパリエトプシンは「parapinopsin-like」、TMT オプシンは「pinopsin-like」と名称の不統一が見られたが、ゼブラフィッシュ等他種における命名を参考に誤謬の起きにくい命名を採用した。パラピノプシンには2つのタイプが存在した (pp1 および pp2)。メラノプシンには大きく分けて m (mammal) 型と x (Xenopus) 型のタイプが存在し、さらに各々に2つのサブタイプが存在した (Opn4m1、Opn4m2、Opn4x1 および Opn4x2)。また、Opn4m2 には 108 bp の挿入配列の有無により長さの異なる2つの変異体が認められた (Opn4m2S および Opn4m2L)。以上を総合して12の非視覚オプシン遺伝子が確認された。

3.3.2 マツカワ非視覚オプシンの組織発現

前節において単離された様々な非視覚オプシンがいずれの組織において発現するかを検討するために、成魚 (未成熟魚、15ヶ月齢) の全脳、眼球、有眼側皮膚 (鱗を含

む) および無眼側皮膚(同)における各オプシンの発現を RT-PCR にて検討した。クローニングに用いた仔魚全身 RNA を各オプシン遺伝子発現のポジティブコントロールに用い、各臓器 RNA の質に対するポジティブコントロールとして β -アクチンの RT-PCR を行った。その結果、パラピノプシン 2、Opn4m2S および Opn4x2 以外のオプシン mRNA は脳で発現し、エクソロドプシンおよび TMT オプシン以外は眼球において発現がみられた。また、Opn3、Opn4x1 および Opn5 の mRNA は皮膚において発現し、有眼側および無眼側の間に発現の差は見られなかった(図 3-2)。

3.3.3 マツカワ非視覚オプシンの最大吸収波長測定

12 種の非視覚オプシンについて、第一章および第二章で行ったのと同様に再構成による λ_{\max} の測定を試みた。エクソロドプシン、VAL オプシン、パラピノプシン 1 と 2、パリエトプシンおよび TMT オプシンについては再構成視物質の差スペクトルにより λ_{\max} の測定が可能であったが、Opn3、Opn4(全サブタイプ) および Opn5 に関しては測定が不可能であった。各オプシンの λ_{\max} は、エクソロドプシン: 約 500 nm、VAL オプシン: 約 510 nm、パラピノプシン 2: 約 410 nm、パラピノプシン 1、パリエトプシンおよび TMT オプシンが約 390 nm であった(図 3-3)。

3.4 考察

3.4.1 非視覚オプシンの発現組織

マツカワ非視覚オプシンの一部は脳で発現していた。エクソロドプシンとパラピノプシン 1 のように他魚種において松果体における発現が報告されているオプシン(Kojima et al 2000) は、マツカワにおいても松果体で発現しているものと推測される。VAL オプシンは網膜の水平細胞やアマクリン細胞のみならず、脳深部(脳室近傍神経核)に発現するという報告がある(Kojima et al. 2000)。古典的に、硬骨魚においてこの脳室近傍神

経核は体色調節機能に対する光受容能があると報告されている (von Frisch 1911)。硬骨魚類における代表的な体色調節ホルモンである、視床下部外側野に発現するメラニン凝集ホルモン (MCH) ニューロンの投射先とも近傍であることから、これら脳深部において直接的に光受容が行われて体色調節に関与する可能性が考えられる。イグアナにおいてパリエトプシン ($\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$) はパラピノプシン (UV 感受性) とともに parietal eye で発現し、松果体関連組織である副松果体 (parapineal) における波長感受性を司るとされる (Wada et al. 2012)。マツカワにおいてはパラピノプシン 1、2 およびパリエトプシンともに UV 感受性であると考えられるため、イグアナの例とは異なっている可能性が高い。比較的近いクレードである Opn3 や TMT オプシンは様々な組織での発現が報告されている。魚から爬虫類および鳥類において、Opn3 および TMT オプシンが小脳皮質 (分子層 やプルキンエ細胞層) に発現する報告がある (Kato et al. 2016)。また、ヒトを含む哺乳類の色素細胞において Opn3 の発現が報告され、実際に *ex vivo* でのアッセイによって近紫外線 (415 nm) 照射により色素合成が活性化する報告がある (Regazzetti et al. 2018)。Opn3 と同様種々の組織での発現が確認された Opn5 に関して、硬骨魚に多くのサブタイプが存在することが近年明らかになってきた (Sato et al. 2016)。そのうちの一部 (Opn5m、Opn5m2) は網膜でも視床下部を含む脳深部でも発現が確認されている。しかし、Opn5m を含めて Opn5 の感受性は紫外線感受性である (<400 nm)。

多くのサブタイプに分化している Opn4 が、発現組織が大きく異なるのは興味深い知見である。Opn4m 型において、m1 型は眼球にしか発現がみられないのに対し、m2 型の short type は眼球で、long type は脳と眼球の双方に発現していた。Opn4x 型においては、x2 型は眼球のみに発現がみられる一方で、x1 型は脳、眼球および皮膚全てにおいて発現がみられた。分子としてより類似する遺伝子間 (m1 と m2、x1 と x2) では機能も類似する可能性が高いが、発現組織のパターンは類似しないということは、特定の組織において特定の機能が使い分けられる必然性が強く示唆される。当研究においては

Opn4 の再構成に成功しなかったが、多種での知見 (Davies et al. 2011, Matos-Cruz et al. 2011) から m 型と x 型の間で機能 (λ_{\max}) が異なっている可能性が示唆される。多種での知見から Opn4 が網膜神経節細胞に発現する (Eilertsen et al. 2014) 可能性が考えられるが、 λ_{\max} の異なる複数タイプが発現するならば、波長特異性の高い未知の光受容体が備わっている可能性がある。マツカワにおける緑色光照射による成長促進にこれらオプシンが光受容を担っているかは不明であるが、*in situ hybridization* などによる発現組織と細胞の同定、機能阻害実験等を行うことで今後の新たな知見につながるものと期待される。

3.4.2 緑色光受容性の非視覚オプシン

マツカワ非視覚オプシンの λ_{\max} 測定を試みた結果、*opn3*、*opn4*、*opn5* 以外は測定に成功した。パリエトプシン、パラピノプシン 1 と 2 および TMT オプシンの λ_{\max} は 400 nm 程度であった一方、エクソロドプシンおよび VAL オプシンの λ_{\max} は 500 nm 程度であった。

マツカワの成長を亢進させる緑色 LED 光の波長は 518 nm であった。よって、これらの 500 nm 程度に λ_{\max} をもつオプシンならば十分に受容しうる。これらの緑色光感受性オプシンの発現組織は一般に、エクソロドプシンおよびパラピノプシンは松果体に (Kawano et al. 2007)、VAL オプシンは網膜 (水平細胞とアマクリン細胞) や脳深部に (Cheng et al. 2009) である。マツカワにおいてもエクソロドプシンが脳において、パラピノプシン 2 や VAL オプシンが脳と眼球双方において発現することが認められた (図 3-2)。概日時計の本体であると同時に視交叉上核や室傍核等の視床下部への影響を与える松果体に緑色光受容性のオプシンが発現すること、そして脳深部においても緑色光受容性の VAL オプシンが発現することは、内分泌器官において直接的に光受容が行われている可能性を示す重要な知見である。視覚オプシンレパートリーの探査では RH2-B、

RH2-CおよびSWS2Aが緑色光による成長亢進効果を担う可能性を示したが(第一章)、本章ではエクソロドプシンおよびVAL オプシンも候補である可能性を示した。

【総合考察】

本研究では、カレイ目魚種に対する緑色光照射が成長を促進させる機構を探る端緒として、マツカワオプシンの機能解析を中心に研究を行った。

第一章において、マツカワの視覚オプシン遺伝子の単離と機能解析について記述した。マツカワ視覚オプシンのレパートリーに関して以下の特徴を見出した；①本来青色光感受性であるSWS2Aは緑色感受性に進化していた。②緑色光感受性オプシンであるRH2の一つ、RH2-Aは偽遺伝子化していた。③緑色光感受性であるRH2-BおよびSWS2Aは成長に伴い眼球内の相対的発現量が増加した。これらのことから、マツカワの緑色光感受性のオプシンには多くの特徴があることが分かった。

第二章において、カレイ目4種間で行った視覚オプシンの比較について記述した。第一章において見出されたマツカワオプシンの特徴のうち、SWS2Aの波長感受性に関する進化過程について検討した。その結果、カレイ科の共通祖先からマツカワ属の共通祖先の系統が分岐した後におきたと考えられる、1つのアミノ酸置換がSWS2Aの緑色光感受性化に大きな役割を果たした可能性を見出した。

第三章において、マツカワの非視覚オプシンを探索と機能の解析を行った。マツカワの非視覚オプシンレパートリーは硬骨魚類として妥当であり、多くのオプシンは脳や皮膚などの非視覚器官に発現するうえ、再構成に成功したオプシンの一部は緑色光に λ_{\max} をもつことが分かった。

第一章から第三章を通じて判明した重要な事項は、マツカワには、緑色光に λ_{\max} をもつオプシンが視覚オプシンにも非視覚オプシンにも多く存在することである。視覚オプ

シンでは RH2-B、RH2-C および SWS2A が緑色光感受性であり、非視覚オプシンではエクソロドプシンおよび VAL オプシンが緑色光感受性であった。これら全てが緑色光照射による成長促進を媒介する光受容分子の候補であると考えられる。

眼球に発現する視覚オプシンまたは非視覚オプシンに関しては、視神経が視交叉上核で分岐して視床下へ投射する。視交叉上核からは種々のニューロンが視床下外側野、弓上核および室傍核などの代謝や食欲を調節すると考えられている核へと投射するため、成長へと諸々の効果があることが予測される。

エクソロドプシンやパラピノプシンなどの松果体に発現することが予測されるオプシンも緑色光感受性であった。松果体からのニューロンが、視床下弓上核へ投射してアグーチ関連タンパク (AgRP) を介して、または松果体そのものでも AgRP を介して食欲調節を行っているという知見がある (Zhang et al. 2010)。よって、これらの光受容系も成長に関わる可能性は大きい。

脳深部、特に視床下近傍に発現するオプシンも報告されている (Kato et al. 2016)。直接、または少数の段階を踏み、上記のような中枢にシグナルが届く可能性も否定できない。以上のように、食欲調節中枢である視床下部へアクセス可能な光受容系は多くあるものの、直接的な証左はまだ存在しない。また末梢に発現するオプシンの報告も多々ある。皮膚においては opn3、opn4 および opn5 などの Gt 共役型ではないオプシンの報告があり (Regazzetti et al. 2016, Haltaufderhyde et al. 2015)、実際にマツカワの皮膚においてもこれらのオプシン遺伝子が発現していることが確認された (図 3-2)。これらのオプシンが末梢組織で光受容を行い、直接末梢組織の成長に効果を持つ可能性は否定できない。

脳深部において、緑色光感受性の非視覚オプシンが発現する部位の特定が重要である。これらの部位に発現する非視覚オプシンが、直接でも間接でも影響を仲介している可能性は十分にあるためである。サクラマスの血管嚢が短日または長日のリズムを司る器官

であり且つ直接に光受容能がある (Nakane et al. 2013) ことが近年分かってきたように、どのような組織にも光受容能がある可能性は十分にある。よって、各種オプシンに対して組織学的な発現解析を進めていくことが今後の課題になると考える。

また、系統的に特定波長光照射の効果を比較検討することが必要である。現状、様々なカレイにおいて特定波長光照射による摂食亢進および成長促進が認められている (Takahashi et al. 2016、 Shimizu et al. 2019)。この際には食欲調節ホルモンの発現が緑色光照射によって亢進していることから、光受容の影響を受けた内分泌系の関与が示唆される。ところが筆者らの予備実験ではこれまでのところ、サケ科 (ニジマス) でもコイ科 (ゼブラフィッシュ、キンギョ) においても特定波長光照射による摂餌行動の活発化は認められなかった。よって、まずはカレイ目に系統的に近いとされるスズキ目の魚種で効果を検討し、もし効果があれば光受容機能および内分泌動態を検討しつつ、カレイ目から少しずつ離れた系統において検討を重ねることが必要である。カレイ目やスズキ目が属する棘鰭上目には食用とされる魚種が多く属しており、また養殖対象の魚種も多い。これらの魚種において特定波長光飼育による成長促進が樹立されることで、持続可能な水産業に対して貢献が可能であると考えられ、また広い系統における光受容と内分泌作用の関連について理解が進むものと期待される。

【謝辞】

筆者が東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻在籍時に、また本論文の研究にあたり終始ご指導いただきました河村正二教授ならびに人類進化システム研究室の皆様にご心よりの深謝を申し上げます。本論文の研究内容の大部分の遂行をさせていただき、多大なご指導を頂きました北里大学海洋生命科学部 高橋明義教授、水澤寛太准教授ならびに魚類分子内分泌学研究室の皆様にご深謝の意を表します。マツカワを分与頂いた国立研究開発法人水産研究・教育機構 北海道区水産研究所の村上直人氏、ホシガレイならびにババガレイを分与頂いた国立研究開発法人水産研究・教育機構 東北区水産研究所の清水大輔氏、ヒラメを分与頂いた神奈川県水産技術センターの長谷川修氏に感謝を致します。

【図表の説明】

図 1-1

マツカワオプシン (LWS: AB930175, RH2-A: AB930285, RH2-B: AB930177, RH2-C: AB930178, SWS2A: AB930180, SWS2B: AB930181, SWS1: AB930179, and RH1: AB930176) および棘鱗上目魚種のオプシンアミノ酸配列を用いた近隣結合法に基づく系統樹。各オプシンの λ_{\max} 値をカッコ内に示す。出所は *M. zebra*: Parry et al. 2005、*L. goodie*: Yokoyama et al. 2007、*O. niloticus*: Spady et al. 2006、*O. latipes*: Matsumoto et al. 2006。スケールバーは 20% のアミノ酸変異を示す。

図 1-2

マツカワおよびメダカの RH2-A アミノ酸配列比較を示す。異なるアミノ酸残基は灰色で強調した。矢頭で表示したアスタリスクはストップコドン (TAA) を示す。マツカワ RH2-A のストップコドン以下の推定アミノ酸配列を小文字で示した。

図 1-3

マツカワゲノム DNA を用いた LWS、RH2-A、RH2-B、RH2-C、SWS1、SWS2A、SWS2B および RH1 のサザンブロット解析。各オプシン遺伝子のエクソン 1 に対応する cDNA 断片 (LWS に関してはエクソン 1 および 2 に対応する領域) をプローブに用いた。ゲノム DNA は各々以下の制限酵素を用いて消化した。E: *Eco* RI, P: *Pst* I, S: *Sac* I。 λ / *Hind* III サイズマーカーをスタンダードとして表示した(kb)。

図 1-4

マツカワオプシンの視物質再構成による吸収スペクトル (暗下)。 λ_{\max} 値を土標準偏差で示した。挿入図は [暗スペクトル-明スペクトル] の差スペクトル、SWS1 のみ [暗

スペクトル-酸処理スペクトル]。

図 1-5

リアルタイム定量 RT-PCR によるマツカワ眼球におけるオプシン遺伝子発現量の解析。略記は以下の通り：3 month: 3 ヶ月齢魚、15 month: 15 ヶ月齢魚、27 month: 27 ヶ月齢魚。異なる文字は有意な差を示す (n=6; p < 0.05)。

図 1-6

最大吸光度を 1 として標準化をしたマツカワオプシン吸光特性の概略図。太字の矢印は Yamanome et al. 2009 にて用いられたフィルター透過光のピーク波長を示す。青フィルター光: 446 nm、緑フィルター光: 555 nm、赤フィルター光: 622 nm。

図 1-7

A: 水深ごとに測定された鉛直上向き放射照度を、水面を 100%として各々10%、1%、0.1%に減衰した深度を波長ごとにプロットした図。データは JAMSTEC の公開データベース GODAC (<http://godac.jamstec.go.jp/>) より、2010 年 2 月に測定された数値を用いた。B: A に用いたデータの測定点。

図 2-1

本研究に用いたカレイ目魚種 4 種の系統関係。系統関係については Nelson 2006 に従った。また、標準和名については日本海洋データセンターの生物分類 (http://www.godac.jamstec.go.jp/bismal/j/JODC_J-DOSS/taxontree) に従った。

図 2-2

各種カレイ目魚類の成魚眼球におけるオプシン遺伝子の発現および遺伝子数の解析。

(A) ホシガレイ *V. variegatus* (Vva)、ババガレイ *M. achne* (Mac)、ヒラメ *P. olivaceus* (Pol)の成魚眼球 RNA を用いた RT-PCR。ホシガレイおよびヒラメの RH2-B および RH2-C の発現は PCR では区別がつかないためにまとめて RH2-B/C と表した。RT-PCR 増幅産物は矢印で示した (約 1 kb~1.1kb)。RT (+): RT-PCR、RT (-): 逆転写酵素反応抜き PCR (ネガティブコントロール)。(B) 各カレイ目魚種のゲノム DNA を用いた RH2-A (ババガレイ RH2-A およびヒラメ RH2-A1 : 白矢頭、ヒラメ RH2-B:二重の白矢頭) および RH2-B と RH2-C (黒矢印) のゲノム PCR 解析。アスタリスクは非特異的増幅産物。DNA サイズマーカーをキロ bp (kb) で示す。

図 2-3

ホシガレイ(A) およびババガレイ (B)のゲノム DNA を用いた RH2-B/C のサザンブロット解析。マツカワ RH2-B エクソン 1 に相当する cDNA 断片をプローブに用いた。ゲノム DNA は各々以下の制限酵素を用いて消化した : E: *Eco* RI、P: *Pst* I、Sc: *Sac* I。DNA サイズマーカーをキロ bp で示す (kb)。

図 2-4

マツカワ (Kasagi et al. 2015、第一章) および本章において単離したカレイ目魚種のオプシン配列にもとづく系統樹。系統関係は近隣結合法により推定した。(A): 同義置換 (dS 変異) のみから計算された系統樹 (B): 非同義置換 (dN 変異) のみから計算された系統樹。ブートストラップ法 (500 回) の値を各節に示す。Vmo: マツカワ、Vva: ホシガレイ、Mac: ババガレイ、Pol: ヒラメ、Dre: ゼブラフィッシュ。

図 2-5

視物質再構成により得られたカレイ SWS2A の吸光スペクトル (暗スペクトル)。(A): ホシガレイ、(B): ババガレイ、(C): ヒラメ。 λ_{\max} 値を土標準偏差で示す。[暗スペクトル-明スペクトル] の差スペクトルを各図に挿入した。

図 2-6

JTT モデルにより推定された SWS2A におけるアミノ酸変異。 λ_{\max} の値は 第一章 (Kasagi et al. 2015) および本章 (図 2-4) による。アミノ酸変異の推定確立が 90% 以下のものは下線で示した。波長調節アミノ酸残基 (表 2-5) におきたと考えられる変異は太字で示した。レチナール近傍のアミノ酸残基 (Palczewski et al. 2000) にはアスタリスクを示した。4 種のカレイ目魚種の系統関係は Nelson 2006 に準じた。

図 2-7

再構成による祖先型 SWS2A 視物質の暗スペクトル。(A): カレイ目祖先型 SWS2A、(B): カレイ科祖先型 SWS2A。 λ_{\max} の値を土標準誤差で示す。挿入図は [暗スペクトル-明スペクトル] の差スペクトルを示す。

図 2-8

点変異を導入したカレイ科祖先 SWS2A (A) およびマツカワ属祖先 SWS2A (B) の暗下吸光スペクトル。 λ_{\max} の値を土標準誤差で示す。挿入図は暗スペクトル-明スペクトル] の差スペクトルを示す。

図 2-9

マツカワ属における、A: RH2-A および B: SWS2A の変遷の推定図を示す。RH2-A の変遷については 2.4.2 において考察した 2 通りの可能性を示す。

図 3-1

本章において単離したマツカワ視覚オプシン、非視覚オプシンおよび他生物種の非視覚オプシンアミノ酸配列にもとづく系統樹。系統関係は近隣結合法により推定した。ブートストラップ法 (500 回) の値を各節に示す。Vm から始まる赤字の遺伝子は本研究で単離したマツカワ非視覚オプシンを示す。比較に用いた他生物種の各アミノ酸配列については 3.2.2 節を参照。

図 3-2

マツカワ非視覚オプシン遺伝子の各種組織における発現解析。マツカワ成魚の全脳、眼球、有眼側皮膚、無眼側皮膚 RNA およびネガティブコントロール (NC : ddw) を用いた RT-PCR。ポジティブコントロールには β -アクチンのプライマーを用いた。黄矢頭: Opn4m2 の長い (L 型) または短い (S 型) バリエーション、アスタリスクは非特異的増幅産物。DNA サイズマーカーをキロ bp (kb) で示す。

図 3-3

視物質再構成により得られたマツカワ非視覚オプシンの吸光スペクトル [暗スペクトル-明スペクトルの差スペクトル]。 λ_{\max} はグラフからの見取り値 (nm) を示す。

【参考文献】

【総導入部】

Gilbert, S. (2006) *Developmental Biology*, 8th edition. 455-459. Sinauer Associates Inc.

Warrant, E. J. (2015) Photoreceptor evolution: ancient 'cones' turn out to be rods. *Cuurent Biology* 25, 148-151.

Ross, M.H., Pawlina, W. (2006) *Histology*, 5th edition. 844-853. Lippincott Williams & Wilkins.

Rodieck, R. W. (1998) *The First Steps in Seeing*. Oxford University press

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition, 866-870. Garland Science.

Kawamura, S. (2016) Color vision diversity and significance in primates inferred from genetic and field studies *Genes Genome* 38, 779-791.

Lagman, D., Ocampo Daza, D., Widmark, J., Abalo, X.M., Sundström, G., Larhammar, D. (2013). The vertebrate ancestral repertoire of visual opsins, transducin alpha subunits and oxytocin/ vasopressin receptors was established by duplication of their shared genomic region in the two rounds of early vertebrate genome duplications. *BMC Evol. Biol.* 13, 1–21.

Matsumoto, Y., Fukamachi, S., Mitani, H., Kawamura, S. (2006) Functional characterization of visual opsin repertoire in Medaka (*Oryzias latipes*). *Gene* 371, 268–278.

Kawamura, S., Kasagi, S., Kasai, D., Tezuka, A., Shoji, A., Takahashi, A., Imai, H., Kawata, M. (2016) Spectral sensitivity of guppy visual pigments reconstituted *in vitro* to resolve association of opsins with cone cell types. *Vision Res.* 127, 67–73.

Chinen, A., Hamaoka, T., Yamada, Y., Kawamura, S. (2003) Gene duplication and spectral diversification of cone visual pigments of zebrafish. *Genetics* 163, 663–675.

Wilkins, L., Marshall, N.J., Johnsen, S., Osorio, D. (2016) Modelling colour constancy in fish: implications for vision and signalling in water. *J. Exp. Biol.* 219, 1884–1892.

Yamanome, T., Amano, M., Takahashi, A. (2005) White background reduces the occurrence of staining, activates melanin-concentrating hormone and promotes somatic growth in barfin flounder. *Aquaculture* 244, 323–329.

Yamanome, T., Mizusawa, K., Hasegawa, E., Takahashi, A. (2009) Green light stimulates somatic growth in the barfin flounder *Verasper moseri*. *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol.* 311, 73–79.

Takahashi, A., Kasagi, S., Murakami, N., Furufuji, S., Kikuchi, S., Mizusawa, K., Andoh, T. (2016) Chronic effects of light irradiated from LED on the growth performance and endocrine properties of barfin flounder *Verasper moseri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 232, 101–108.

Shimizu, D., Kasagi, S., Takeuchi, R., Maeda, T., Furufuji, S., Mizusawa, K., Andoh, T.,

Takahashi, A. (2019) Effects of green light on the growth of spotted halibut, *Verasper variegatus*, and Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and on the endocrine system of spotted halibut at different water temperatures. Gen. Comp. Endocrinol. 271, 82–90.

【第一章】

Baker, B. I. (1963) Effect of Adaptation to Black and White Backgrounds on the Teleost Pituitary. Nature 198, 404–404.

Rodrigues, K. T., Sumpter, J. P. (1984) Effects of background adaptation on the pituitary and plasma concentrations of some pro-opiomelanocortin-related peptides in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Endocrinol. 101, 277–284.

Björnsson, B.T. (1997) The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. Fish Physiol. Biochem. 17, 9–24.

Mizusawa, K., Kobayashi, Y., Yamanome, T., Saito, Y., Takahashi, A. (2013) Interrelation between melanocyte-stimulating hormone and melanin-concentrating hormone in physiological body color change: Roles emerging from barfin flounder *Verasper moseri*. Gen. Comp. Endocrinol. 181, 229–234.

Yamanome, T., Chiba, H., Takahashi, A. (2007) Melanocyte-stimulating hormone facilitates hypermelanosis on the non-eyed side of the barfin flounder, a pleuronectiform fish. Aquaculture 270, 505–511.

Andoh, T., Watanabe, K., Matsubara, T. (1999) Problems and perspectives in stock enhancement of barfin flounder. *Bull. Hokkaido Natl. Res. Inst.* 63, 19–33.

Amiya, N., Amano, M., Takahashi, A., Yamanome, T., Kawauchi, H., Yamamori, K. (2005) Effects of tank color on melanin-concentrating hormone levels in the brain, pituitary gland, and plasma of the barfin flounder as revealed by a newly developed time-resolved fluoroimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 143, 251–256.

Yamanome, T., Amano, M., Takahashi, A. (2005) White background reduces the occurrence of staining, activates melanin-concentrating hormone and promotes somatic growth in barfin flounder. *Aquaculture* 244, 323–329.

Sunuma, T., Yamanome, T., Amano, M., Takahashi, A., Yamamori, K. (2009) White background stimulates the food intake of a pleuronectiform fish the barfin flounder, *Verasper moseri* (Jordan and Gilbert). *Aquac. Res.* 40, 748–751.

Papoutsoglou, S., Mylonakis, G., Miliou, H., Karakatsouli, N., Chadio, S. (2000) Effects of background color on growth performances and physiological responses of scaled carp (*Cyprinus carpio L.*) reared in a closed circulated system. *Aquac. Eng.* 22, 309-318.

Strand, Å., Alanärä, A., Staffan, F., Magnhagen, C. (2007) Effects of tank colour and light intensity on feed intake, growth rate and energy expenditure of juvenile Eurasian perch, *Perca fluviatilis L.* *Aquaculture* 272, 312–318.

Yamanome, T., Mizusawa, K., Hasegawa, E., Takahashi, A. (2009) Green light stimulates somatic growth in the barfin flounder *Verasper moseri*. J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol. 311, 73–79.

Head, A.B., Malison, J.A. (2000) Effects of Lighting Spectrum and Disturbance Level on the Growth and Stress Responses of Yellow Perch *Perca flavescens*. J. World Aquac. Soc. 31, 73–80.

Ruchin, A.B. (2005) Influence of Colored Light on Growth rate of Juveniles of Fish. Fish Physiol. Biochem. 30, 175–178.

Luchiari, A.C., Pirhonen, J. (2008) Effects of ambient colour on colour preference and growth of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Biol. 72, 1504–1514.

Shin, H.S., Lee, J., Choi, C.Y. (2012) Effects of LED light spectra on the growth of the yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii*. Fish. Sci. 78, 549–556.

Kawamura S. (2011) Evolutionary Diversification of Visual Opsin Genes in Fish and Primates. In: Inoue-Murayama M., Kawamura S., Weiss A. From Genes to Animal Behavior. 329-349. Primatology Monographs. Springer, Tokyo

Hamaoka, T., Takechi, M., Chinen, A., Nishiwaki, Y., Kawamura, S. (2002) Visualization of rod photoreceptor development using GFP-transgenic zebrafish. Genesis 34, 215–220.

Chinen, A., Hamaoka, T., Yamada, Y., Kawamura, S. (2003) Gene duplication and spectral

diversification of cone visual pigments of zebrafish. *Genetics* 163, 663–675.

Morrow, J.M., Lazic, S., Chang, B.S. (2011) A novel rhodopsin-like gene expressed in zebrafish retina. *Vis. Neurosci.* 28, 325–335

Matsumoto, Y., Fukamachi, S., Mitani, H., Kawamura, S. (2006) Functional characterization of visual opsin repertoire in Medaka (*Oryzias latipes*). *Gene* 371, 268–278.

Helvik, J. V, Drivenes, O., Naess, T.H., Fjose, A., Seo, H.C. (2001) Molecular cloning and characterization of five opsin genes from the marine flatfish Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) *Vis. Neurosci.* 18, 767–780.

Sambrook, J., W Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–9.

Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* 8, 275–82.

Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–25.

Khorana, H.G., Knox, B.E., Nasi, E., Swanson, R., Thompson, D.A. (1988) Expression of a bovine rhodopsin gene in *Xenopus* oocytes: demonstration of light-dependent ionic currents. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85, 7917–7921.

Kawamura, S., Yokoyama, S. (1998) Functional characterization of visual and nonvisual pigments of American chameleon (*Anolis carolinensis*). Vision Res. 38, 37–44.

Oprian, D.D., Molday, R.S., Kaufman, R.J., Khorana, H.G. (1987) Expression of a synthetic bovine rhodopsin gene in monkey kidney cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84, 8874–8.

Molday, R.S., MacKenzie, D. (1983) Monoclonal antibodies to rhodopsin: characterization, cross-reactivity, and application as structural probes. Biochemistry 22, 653–660.

Kobayashi, Y., Mizusawa, K., Yamanome, T., Chiba, H., Takahashi, A. (2009) Possible paracrine function of α -melanocyte-stimulating hormone and inhibition of its melanin-dispersing activity by N-terminal acetylation in the skin of the barfin flounder, *Verasper moseri*. Gen. Comp. Endocrinol. 161, 419–424.

Takahashi, Y., Ebrey, T.G. (2003) Molecular basis of spectral tuning in the newt short wavelength sensitive visual pigment. Biochemistry 42, 6025–6034.

Haug, T. (1990) Biology of the Atlantic Halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L., 1758), Advances in Marine Biology, Advances in Marine Biology. 26, 1-70.

Dartnall, H.J.A. (1975) Assessing the Fitness of Visual Pigments for their Photic Environments. In: Ali M.A. (eds) *Vision in Fishes*. London: Plenum Press, NY, 543-563.

Neafsey, D.E., Hartl, D.L. (2005) Convergent loss of an anciently duplicated, functionally divergent RH2 opsin gene in the fugu and *Tetraodon* pufferfish lineages. *Gene* 350, 161–171.

Yokoyama, S., Starmer, W.T., Liu, Y., Tada, T., Britt, L. (2014) Extraordinarily low evolutionary rates of short wavelength-sensitive opsin pseudogenes. *Gene* 534, 93–9.

Davies, W.L., Collin, S.P., Hunt, D.M. (2009) Adaptive gene loss reflects differences in the visual ecology of basal vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1803–9.

Spady, T.C., Parry, J.W.L., Robinson, P.R., Hunt, D.M., Bowmaker, J.K., Carleton, K.L. (2006) Evolution of the cichlid visual palette through ontogenetic subfunctionalization of the opsin gene arrays. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1538–47.

Yokoyama, S., Tada, T. (2003) The spectral tuning in the short wavelength-sensitive type 2 pigments. *Gene* 306, 91–98.

Bowmaker, J.K. (2008) Evolution of vertebrate visual pigments. *Vision Res.* 48, 2022–2041.

Chinen, A., Matsumoto, Y., Kawamura, S. (2005) Spectral differentiation of blue opsins between phylogenetically close but ecologically distant goldfish and zebrafish. *J. Biol. Chem.* 280, 9460–

9466.

【第二章】

Andoh, T., Watanabe, K., Matsubara, T. (1999) Problems and perspectives in stock enhancement of barfin flounder. Bull. Hokkaido Natl. Res. Inst. 63, 19–33.

Evans, B.I., Hárosi, F.I., Fernald, R.D. (1993) Photoreceptor spectral absorbance in larval and adult winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). Vis. Neurosci. 10, 1065–71.

Hoke, K.L., Evans, B.I., Fernald, R.D. (2006) Remodeling of the cone photoreceptor mosaic during metamorphosis of flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). Brain. Behav. Evol. 68, 241–254.

Mader, M.M., Cameron, D.A. (2004) Photoreceptor differentiation during retinal development, growth, and regeneration in a metamorphic vertebrate. J. Neurosci. 24, 11463–11472.

Kasagi, S., Mizusawa, K., Murakami, N., Andoh, T., Furufuji, S., Kawamura, S., Takahashi, A. (2015) Molecular and functional characterization of opsins in barfin flounder (*Verasper moseri*). Gene 556, 182–91.

Matsumoto, Y., Fukamachi, S., Mitani, H., Kawamura, S. (2006) Functional characterization of visual opsin repertoire in Medaka (*Oryzias latipes*). Gene 371, 268–278.

Spady, T.C., Parry, J.W.L., Robinson, P.R., Hunt, D.M., Bowmaker, J.K., Carleton, K.L. (2006) Evolution of the cichlid visual palette through ontogenetic subfunctionalization of the opsin gene arrays. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1538–47.

Masuda, H., Amaoka, K., Araga, C., Uyeno, T., Yoshino, T. (1984) The fishes of the Japanese archipelago. 346–353. Tokyo: Tokai University Press.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–9.

Nei, M., Gojoborit, T. (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3, 418–426.

Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–25.

Nakamura, Y., Mori, K., Saitoh, K., Oshima, K., Mekuchi, M., Sugaya, T., Shigenobu, Y., Ojima, N., Muta, S., Fujiwara, A., Yasuike, M., Oohara, I., Hirakawa, H., Chowdhury, V.S., Kobayashi, T., Nakajima, K., Sano, M., Wada, T., Tashiro, K., Ikeo, K., Hattori, M., Kuhara, S., Gojobori, T., Inouye, K. (2013) Evolutionary changes of multiple visual pigment genes in the complete genome of Pacific bluefin tuna. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11061–6.

Yang, Z. (2007) PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* 24,

1586–91.

Xu, B., Yang, Z. (2013) PAMLX: a graphical user interface for PAML. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2723–4.

Nelson, J.S. (2006) *Fishes of the World*, 4th Edition. 442-451. New Jersey. Wiley.

Wang, Z., Yonezawa, T., Liu, B., Ma, T., Shen, X., Su, J., Guo, S., Hasegawa, M., Liu, J. (2011) Domestication relaxed selective constraints on the yak mitochondrial genome. *Mol. Biol. Evol.* 28, 1553–6.

Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* 8, 275–82.

Betancur-R, R., Ortí, G. (2014) Molecular evidence for the monophyly of flatfishes (Carangimorpharia: Pleuronectiformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 73, 18–22.

Yokoyama, S., Tada, T. (2003) The spectral tuning in the short wavelength-sensitive type 2 pigments. *Gene* 306, 91–98.

Yokoyama, S., Takenaka, N., Blow, N. (2007) A novel spectral tuning in the short wavelength-sensitive (SWS1 and SWS2) pigments of bluefin killifish (*Lucania goodei*). *Gene* 396, 196–202.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. (2000) Crystal structure of rhodopsin: AG

protein-coupled receptor. *Sci.* (New York, NY) 289, 739–745.

Gojobori, J., Innan, H. (2009) Potential of fish opsin gene duplications to evolve new adaptive functions. *Trends Genet.* 25, 198–202.

Minami, T., Tanaka, M. (1992) Life History cycles in flatfish from the Northwestern Pacific, with particular reference to their early life histories. *Netherlands J. Sea Res.* 29, 35–48.

Münzing, J. (1968) Chapter 11 flounders (226–244). *Animal Life Encyclopedia*, Volume 5. Fishes II and Amphibians. B. Grzimek & W. Ladiges (Eds.), New York, Van Nostrand Reinhold Company Inc.

Wada, T., Mitsunaga, N., Suzuki, H., Yamashiya, Y., Tanaka, M. (2006) Growth and habitat of spotted halibut *Verasper variegatus* in the shallow coastal nursery area, Shimabara Peninsula in Ariake Bay, Japan. *Fish. Sci.* 72, 603–611.

Levine, J.S., MacNichol, E.F. (1982) Color Vision in Fishes. *Sci. Am.* 246, 140–149.

Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y., Postlethwait, J. (1999) Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations. *Genetics.* 151, 1531–1545.

【第三章】

Kasagi, S., Mizusawa, K., Takahashi, A. (2018) Green-shifting of SWS2A opsin sensitivity and loss of function of RH2-A opsin in flounders, genus *Verasper*. *Ecol. Evol.* 8, 1399–1410.

Okano, T., Yoshizawa, T., Fukada, Y. (1994) Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. *Nature* 372, 94–97.

Mano, H., Kojima, D., Fukada, Y. (1999) Exo-rhodopsin: A novel rhodopsin expressed in the zebrafish pineal gland. *Mol. Brain Res.* 73, 110–118.

Fischer, R.M., Fontinha, B.M., Kirchmaier, S., Steger, J., Bloch, S., Inoue, D., Panda, S., Rumpel, S., Tessmar-Raible, K. (2013) Co-expression of VAL- and TMT-opsins uncovers ancient photosensory interneurons and motorneurons in the vertebrate brain. *PLoS Biol.* 11, e1001585.

Blackshaw, S., Snyder, S.H. (1997) Parapinopsin, a novel catfish opsin localized to the parapineal organ, defines a new gene family. *J. Neurosci.* 17, 8083–8092.

Su, C.Y., Luo, D.G., Terakita, A., Shichida, Y., Liao, H.W., Kazmi, M.A., Sakmar, T.P., Yau, K.W. (2006) Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. *Science* 311, 1617–1621.

Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W.J., Hayes, W.P., Rollag, M.D. (1998) Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 340–345.

Kingston, A.C.N., Cronin, T.W. (2016) Diverse Distributions of Extraocular Opsins in Crustaceans, Cephalopods, and Fish. *Integrative and Comparative Biology.* 56, 820–833.

Aritaki, M., Suzuki, S., Watanabe, K. (2000) Morphological Development and Growth of Laboratory-reared Barfin Flounder *Verasper moseri*. Nippon Suisan Gakkaishi 66, 446-453.

Kojima, D., Mano, H., Fukada, Y. (2000) Vertebrate ancient-long opsin: a green-sensitive photoreceptive molecule present in zebrafish deep brain and retinal horizontal cells. J. Neurosci. 20, 2845–2851.

von Frisch, K. (1911) Beiträ:ge zur Physiologie der Pigmentzellen in der Fischhaut (German). Pflügers Arch. 138, 319-387

Wada, S., Kawano-Yamashita, E., Koyanagi, M., Terakita, A. (2012) Expression of UV-sensitive parapinopsin in the iguana parietal eyes and its implication in UV-sensitivity in vertebrate pineal-related organs. PLoS One 7.

Kato, M., Sugiyama, T., Sakai, K., Yamashita, T., Fujita, H., Sato, K., Tomonari, S., Shichida, Y., Ohuchi, H. (2016) Two Opsin 3-Related Proteins in the Chicken Retina and Brain: A TMT-Type Opsin 3 Is a Blue-Light Sensor in Retinal Horizontal Cells, Hypothalamus, and Cerebellum. PLoS One 11, 1–23.

Regazzetti, C., Sormani, L., Debayle, D., Bernerd, F., Tulic, M.K., De Donatis, G.M., Chignon-Sicard, B., Rocchi, S., Passeron, T. (2018) Melanocytes Sense Blue Light and Regulate Pigmentation through Opsin-3. J. Invest. Dermatol. 138, 171–178.

Sato, K., Yamashita, T., Haruki, Y., Ohuchi, H., Kinoshita, M., Shichida, Y. (2016) Two UV-

sensitive photoreceptor proteins, Opn5m and Opn5m2 in ray-finned fish with distinct molecular properties and broad distribution in the retina and brain. PLoS One 11.

Davies, W.I.L., Zheng, L., Hughes, S., Katherine Tamai, T., Turton, M., Halford, S., Foster, R.G., Whitmore, D., Hankins, M.W. (2011) Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. Cell. Mol. Life Sci. 68, 4115–4132.

Matos-Cruz, V., Blasic, J., Nickle, B., Robinson, P.R., Hattar, S., Halpern, M.E. (2011) Unexpected diversity and photoperiod dependence of the zebrafish melanopsin system. PLoS One 6.

Eilertsen, M., Drivenes, Ø., Edvardsen, R.B., Bradley, C.A., Ebbesson, L.O.E., Helvik, J.V. (2014) Exorhodopsin and melanopsin systems in the pineal complex and brain at early developmental stages of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). J. Comp. Neurol. 522, 4003–4022.

Kawano-Yamashita, E., Terakita, A., Koyanagi, M., Shichida, Y., Oishi, T., Tamotsu, S. (2007) Immunohistochemical characterization of a parapinopsin-containing photoreceptor cell involved in the ultraviolet/green discrimination in the pineal organ of the river lamprey *Lethenteron japonicum*. J. Exp. Biol. 210, 3821–3829.

Cheng, N., Tsunenari, T., Yau, K. W. (2009) Intrinsic light response of retinal horizontal cells of teleosts. Nature 460, 899–903.

Zhang, C., Song, Y., Thompson, D.A., Madonna, M.A., Millhauser, G.L., Toro, S., Varga, Z., Westerfield, M., Gamse, J., Chen, W., Cone, R.D. (2010) Pineal-specific agouti protein regulates teleost background adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 20164–20171.

Haltaufderhyde, K., Ozdeslik, R.N., Wicks, N.L., Najera, J.A., Oancea, E. (2015) Opsin expression in human epidermal skin. *Photochem. Photobiol.* 91, 117–123.

Nakane, Y., Ikegami, K., Iigo, M., Ono, H., Takeda, K., Takahashi, D., Uesaka, M., Kimijima, M., Hashimoto, R., Arai, N., Suga, T., Kosuge, K., Abe, T., Maeda, R., Senga, T., Amiya, N., Azuma, T., Amano, M., Abe, H., Yamamoto, N., Yoshimura, T. (2013) The saccus vasculosus of fish is a sensor of seasonal changes in day length. *Nat. Commun.* 4, 3108

表 1-1 cDNAクローニング・インバースPCR・視物質再構成用発現コンストラクト作製に用いたオリゴDNAプライマー一覧

| 遺伝子 | | 塩基配列 |
|-------|---------------------|---|
| LWS | Internal forward | GAMCCITTYGARGGICCIAA |
| | Internal reverse | TTIGCRAARTAIGCIGGCAT |
| | 5' RACE | AGCTGTCGCCACCAAGACAAGACC |
| | 3' RACE | CGATGCAGCAGAAGGAATCGGAGT |
| | External forward | ACTGTTGAGGGCTCTCCTGC |
| | External reverse | CCCCCAAATTAGAGAACATGGAG |
| | pMT5 forward | ATGGT <u>GGAATTC</u> ACCACATGGCAGAAGAGTGGGGAAA |
| | pMT5 reverse | TAACAT <u>GTCGAC</u> GCAGGAGCCACAGATGAGACCT |
| RH2-A | Internal forward | GAGGGCAAGAACTTCTACATCCC |
| | Internal reverse | GCATGCAGTTACGGAACTGTTTGTTC |
| | Inverse-PCR forward | GTCATTCGTCTTGTTTCATGTTACCTG |
| | | CCTCAGCGCTGTTCAACCCTA |
| | Inverse-PCR reverse | AGGAGGAATAGCGCAGGAGG |
| | | CTGTTTGTTC AACAGCACATAGAT |
| | External forward | CAATTCAATCCTAACTAAGCAAAG |
| | External reverse | TGTTGGGAATGGTCTGTGT |
| RH2-B | Internal forward | GARGGITYATGGCIACIYTNGG |
| | Internal reverse | CATRCARTTICKRAAYTYGTT |
| | 5' RACE | GGACGACCAGAGACCAGAGA |
| | 3' RACE | CATCCCTGCCTTCTTTGCTA |
| | External forward | CCAAAGAAGCTCAATAGAAACAACAGACAAC |
| | External reverse | GACAGTGGAAGGAAAATGTCCAGGT |
| | pMT5 forward | GTACG <u>AATTC</u> ACCACATGGTTTGGGATGGTGAATCGA |
| | pMT5 reverse | TGGTTC <u>GTCGAC</u> GAGACAGAGGACACTTCTGTTT |
| RH2-C | Internal forward | GCCGCAACAGGTTGTGCCTT |
| | Internal reverse | GGGACACAGAAGTGGCAGG |
| | 5' RACE | ACAAGCTTGTACATGATGGGATCCG |
| | 3' RACE | GTACCATATGCCACTTTCGCCTC |
| | External forward | CCAGCGAAGGCGACCAAAC |
| | External reverse | GAGAGGGGCGTGATCACGA |
| | pMT5 forward | GTACG <u>AATTC</u> ACCACATGTCTTGGGACGGAGGAATCGA |
| | pMT5 reverse | TGGTTC <u>GTCGAC</u> GACACAGAGGACACCTCTGTCT |

表 1-1 cDNAクローニング・インバースPCR・視物質再構成用発現コンストラクト作製に用いたオリゴDNAプライマー一覧(続き)

| 遺伝子 | | 塩基配列 |
|-------|------------------|---|
| SWS1 | Internal forward | GGGAAACACTTCCACCTGTATGAGAA |
| | Internal reverse | AGATGATTCGTCCATTTTCTTTCCAAACACTG |
| | 5' RACE | GAGTGCCAGCGAACAGGACGGAGCCCATG |
| | 3' RACE | CGACTCGTCACCATCCCGGCATTTTCTCCAAGAGCTC |
| | External forward | CATGGGGAGAAAGCTCAGGTTC |
| | External reverse | CATCCGACATCACTTCTAATTTGTTCAAACA |
| | pMT5 forward | ATGGTTGAATTCCACCATGATGGGGAAACACTTCCA |
| | pMT5 reverse | ATGTTACTCGAGTTAACTGTGGAAACTGAAGAT |
| SWS2A | Internal forward | GGHGGHATGGTIWSIYTITGG |
| | Internal reverse | CCICKRTRRTIACIACCCA |
| | 5' RACE | CACTGCATACCCTCCGGGATGTACC |
| | 3' RACE | TGCTGGGCGCCCTACACTACCTT |
| | External forward | CTTGTTTGCCCGTGGGGGAAA |
| | External reverse | CTGTGGAAAACGTTGTGGATGTTTCAG |
| | pMT5 forward | GTACGAGAATTCCACCATGAAGCACGGCCGGGT |
| | pMT5 reverse | TGGTTTCGTCGACGACGAGCCCAACTTTGGAGACTTCGG |
| SWS2B | Internal forward | TCCTCCGTGGGCTCTTTCAC |
| | Internal reverse | GAGCCTTTGCTACCGATTTTCAGCA |
| | 5' RACE | GCCCACGGAGGAGACGAGGAGGTTTG |
| | 3' RACE | GATTTACAGCATGAAGAGCAGCTGTGAGTAGC |
| | External forward | CATTTGACAAACAACCAGAGG |
| | External reverse | CTTTCAGTGCTATTTACACTCTATG |
| | pMT5 forward | GTACGAGAATTCCACCATGAGGGGAAATCGCCC |
| | pMT5 reverse | TGGTTTCGTCGACGACGAGTCCGACTTTAGAG |
| RH1 | Internal forward | ATGAAAYGGIACIGARGGICC |
| | Internal reverse | CCICCYTCYTCYTCYTCRAA |
| | 5' RACE | AGCCGACGAGGATGAGCAGGAAC |
| | 3' RACE | GTTCCGCCGTCTACAACCCATTGA |
| | External forward | CGCAAACCGCAAGCCGCAA |
| | External reverse | CATGGAGCCTTTGTAATGGCCCT |
| | pMT5 forward | ATGGTTGAATTCCACCATGAATGGCACAGAGGGACC |
| | pMT5 reverse | TAACATGTCGACGCTGGTGAGACAGAGCTGGAGG |

I: (イノシン), R: (A or G), S: (C or G), W: (A or T), Y: (C or T), H: (A or C or T) および N: (any of A, C, G or T)を示した。EcoRI および SalI リンカーは下線で示した。開始コドンは太字で示した。

表 1-2 定量RT-PCRに用いたオリゴDNAプライマーおよびTaqMan probe 一覧

| 遺伝子 | | 塩基配列 |
|-------|--------------|-----------------------------------|
| LWS | Forward | GGCTATACTGTCTCAGTGTGT |
| | Reverse | GTTGCCCATTTGGCATCAA |
| | TaqMan probe | CCTGGGAGAGATGGGTAGTTGTGTGCA |
| RH2-B | Forward | CTACATGTTTGTGGTCCACTTCTTCTT |
| | Reverse | AGCAAAAGTGGCATATGGGGT |
| | TaqMan probe | CAGCAGCAGGAGTCAGAGTCCACCC |
| RH2-C | Forward | TGTCGTCCACTTCACGGC |
| | Reverse | AGGCGAAAGTGGCATATGGTAC |
| | TaqMan probe | RH2-Bと同一 |
| SWS1 | Forward | ATTGGTACACGCACAACGAGG |
| | Reverse | GACTCCGTCTGCTGAGCTGC |
| | TaqMan probe | TGACGTGCTTCATCCTTCCGCTCAC |
| SWS2A | Forward | GTGGGCTCCTTTGTTG |
| | Reverse | CAAACACCCAGGTGAATATG |
| | TaqMan probe | TTGGTGGTATGGTCAGCCTGTGGTCTCTGGCTG |
| SWS2B | Forward | GTGGGCTCTTTCACCT |
| | Reverse | AAAGACCCACGTTAGAGCA |
| | TaqMan probe | SWS2Aと同一 |
| RH1 | Forward | TTGGAGGATTCACCACAACGA |
| | Reverse | ACCTCCGAGGGTTGCAAAG |
| | TaqMan probe | ATGCATGGCTACTTCGTTCTAGGT |

TaqMan probe は全て、5' 端が6-FAM・3' 端がTAMRAで標識。

表 1-3 マツカワオプシンの配列相動性(%)

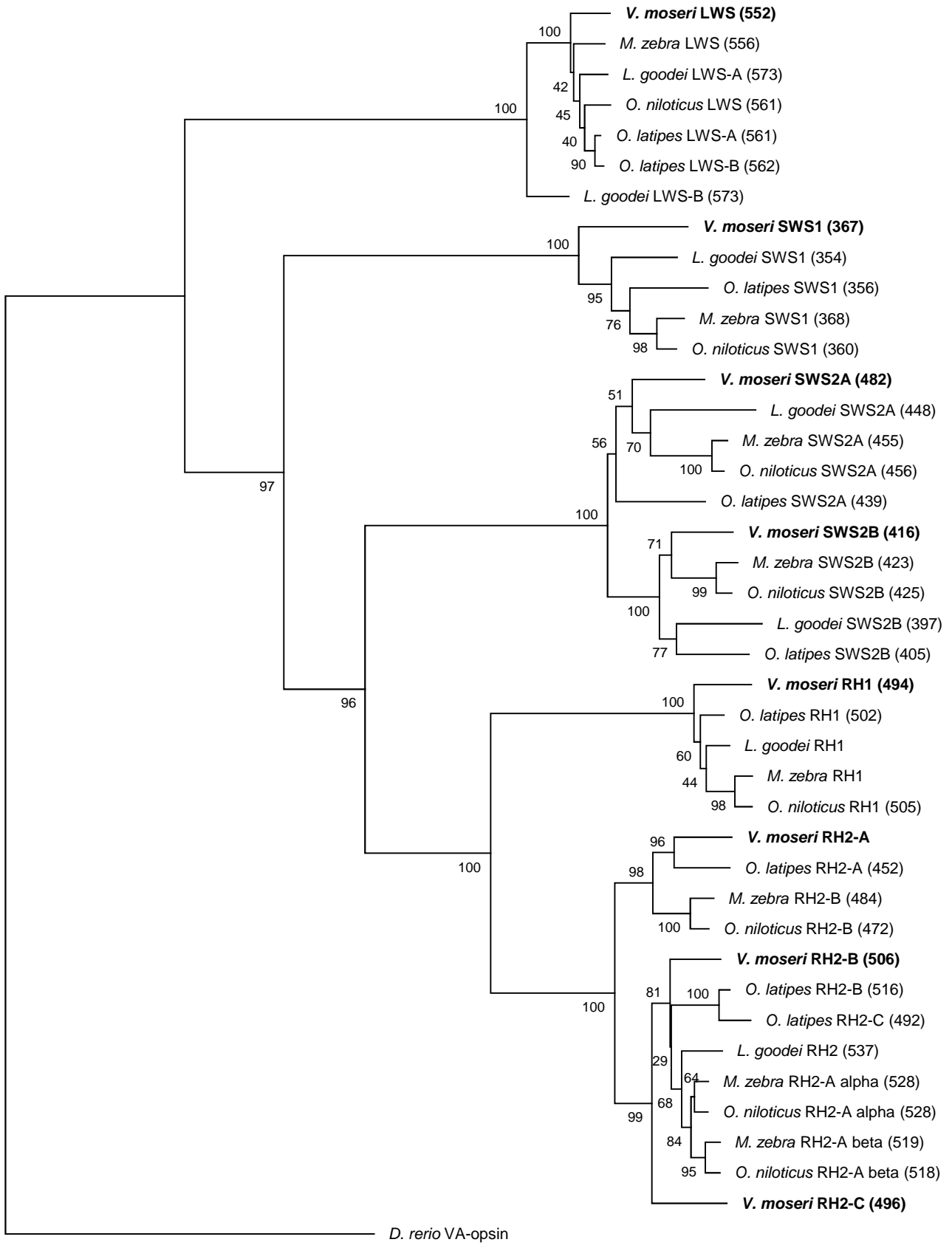
| | LWS | RH2-A | RH2-B | RH2-C | SWS1 | SWS2A | SWS2B | RH1 |
|-------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|
| LWS | | 42.9 | 44.3 | 43.5 | 43.8 | 41.4 | 39.8 | 42.3 |
| RH2-A | 52.9 | | 75.7 | 75.7 | 48.5 | 51.9 | 53.0 | 61.7 |
| RH2-B | 54.5 | 77.9 | | 86.6 | 47.0 | 52.8 | 49.7 | 62.5 |
| RH2-C | 53.7 | 77.5 | 88.5 | | 48.8 | 52.8 | 49.7 | 62.5 |
| SWS1 | 52.4 | 56.2 | 55.7 | 56.4 | | 45.9 | 43.8 | 44.4 |
| SWS2A | 52.3 | 58.4 | 56.6 | 57.4 | 53.2 | | 77.0 | 49.7 |
| SWS2B | 49.6 | 58.5 | 55.8 | 55.7 | 52.7 | 78.2 | | 50.9 |
| RH1 | 51.9 | 63.7 | 64.8 | 64.1 | 53.0 | 56.3 | 57.5 | |

総当たりのアミノ酸配列相動性(左下)および核酸配列相動性(右上)

表 1-4 棘鱗上目魚種のSWS2Aにおける代表的な波長調節アミノ酸サイト

| 調節サイト | λ_{\max} (nm) | <i>O. niloticus</i> | <i>M. zebra</i> | <i>L. Goodei</i> | <i>O. latipes</i> | <i>V. moseri</i> |
|-------|-----------------------|---------------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|
| | | 456 | 455 | 455 | 439 | 482 |
| 46 | | F | F | L | F | F |
| 49 | | I | I | V | V | V |
| 52 | | T | T | T | T | T |
| 93 | | T | T | T | T | V |
| 94 | | A | A | A | A | G |
| 116 | | M | M | I | A | M |
| 118 | | T | T | T | T | T |
| 164 | | A | A | A | A | A |
| 207 | | L | L | L | L | L |
| 269 | | A | A | A | A | T |
| 295 | | S | S | S | S | S |

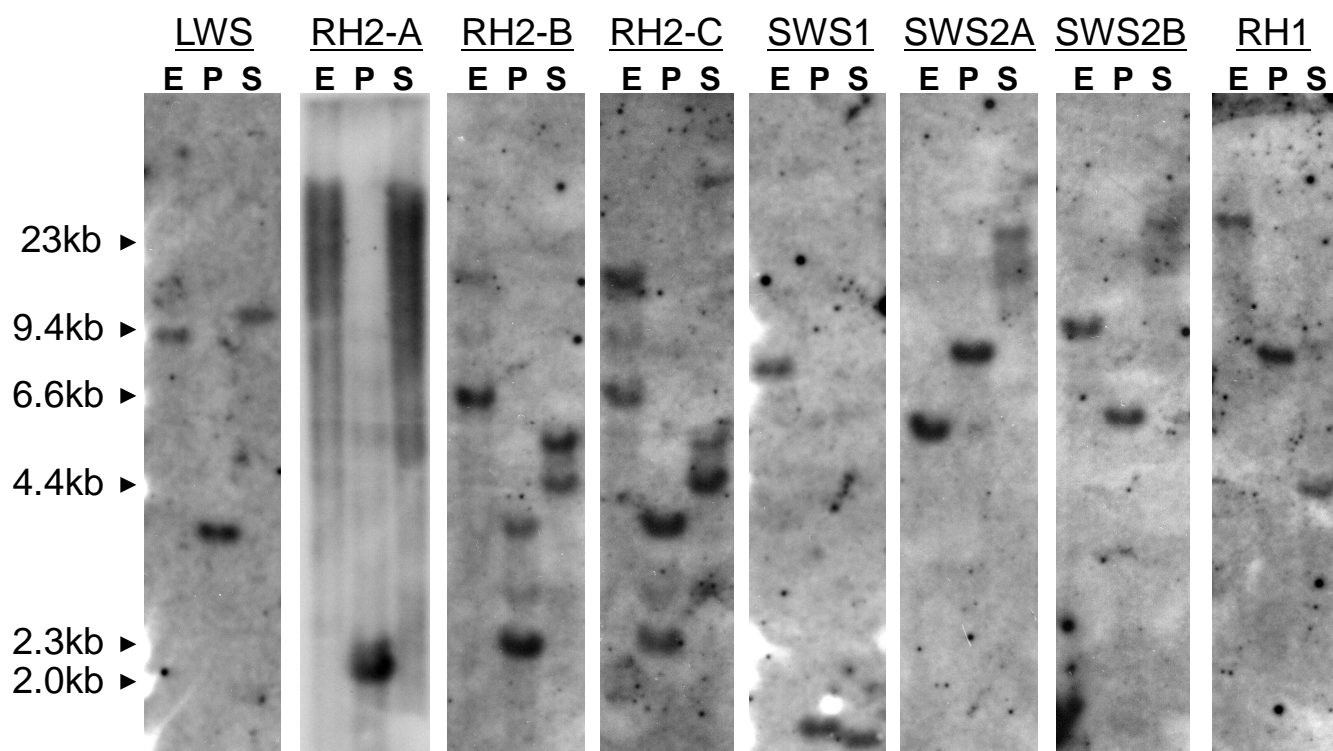
アミノ酸番号はウシロドプシンにおけるアミノ酸番号 (Palczewski et al., 2000) に揃えた。各サイトのアミノ酸残基および λ_{\max} の値は *O. niloticus*: Spady et al., 2006、*M. zebra*: Parry et al., 2005、*L. goodie*: Yokoyama et al., 2007、*O. latipes*: Matsumoto et al., 2006、および *V. moseri*: Kasagi et al., 2015 (当研究) に従った。

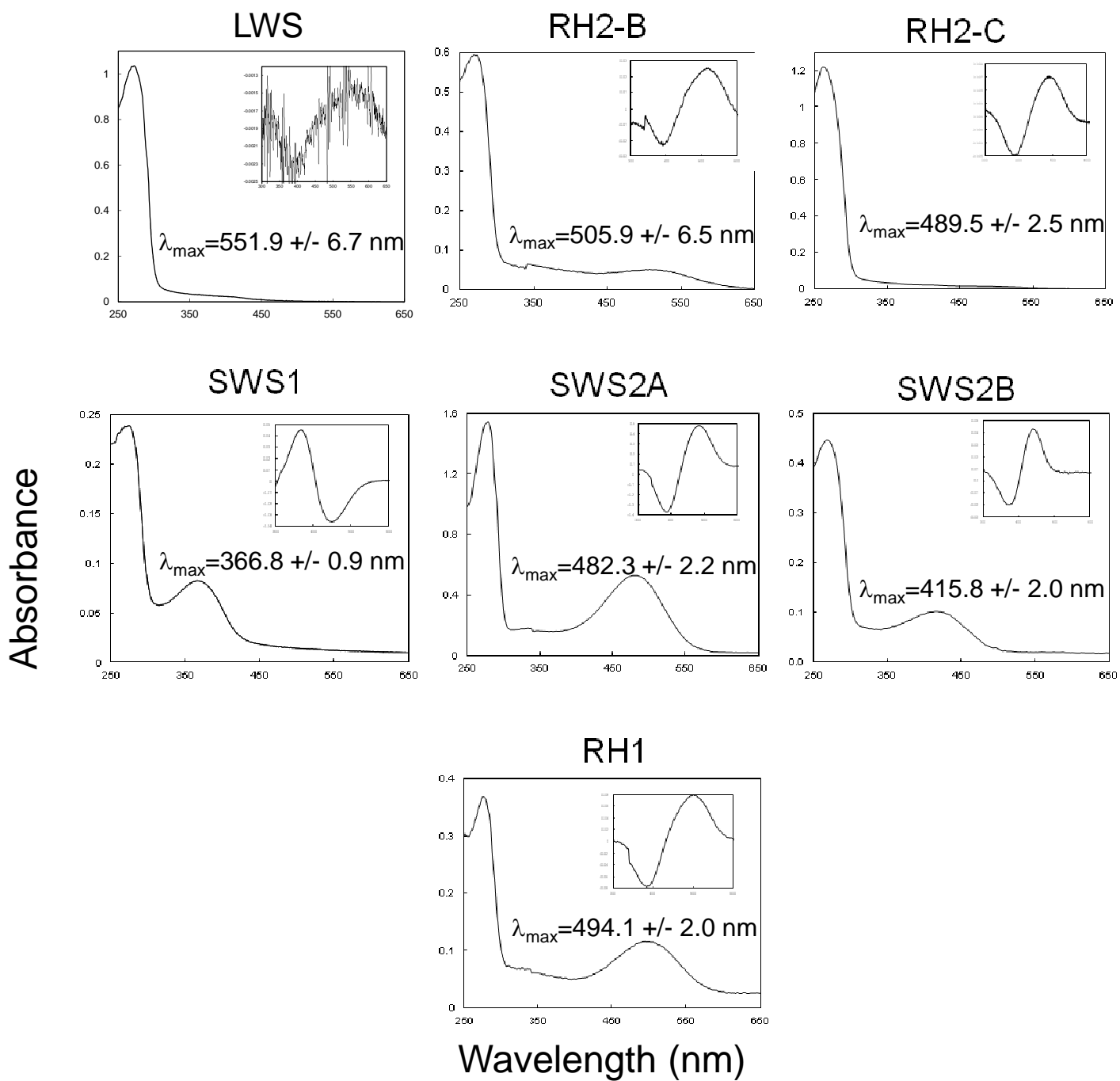


0.1

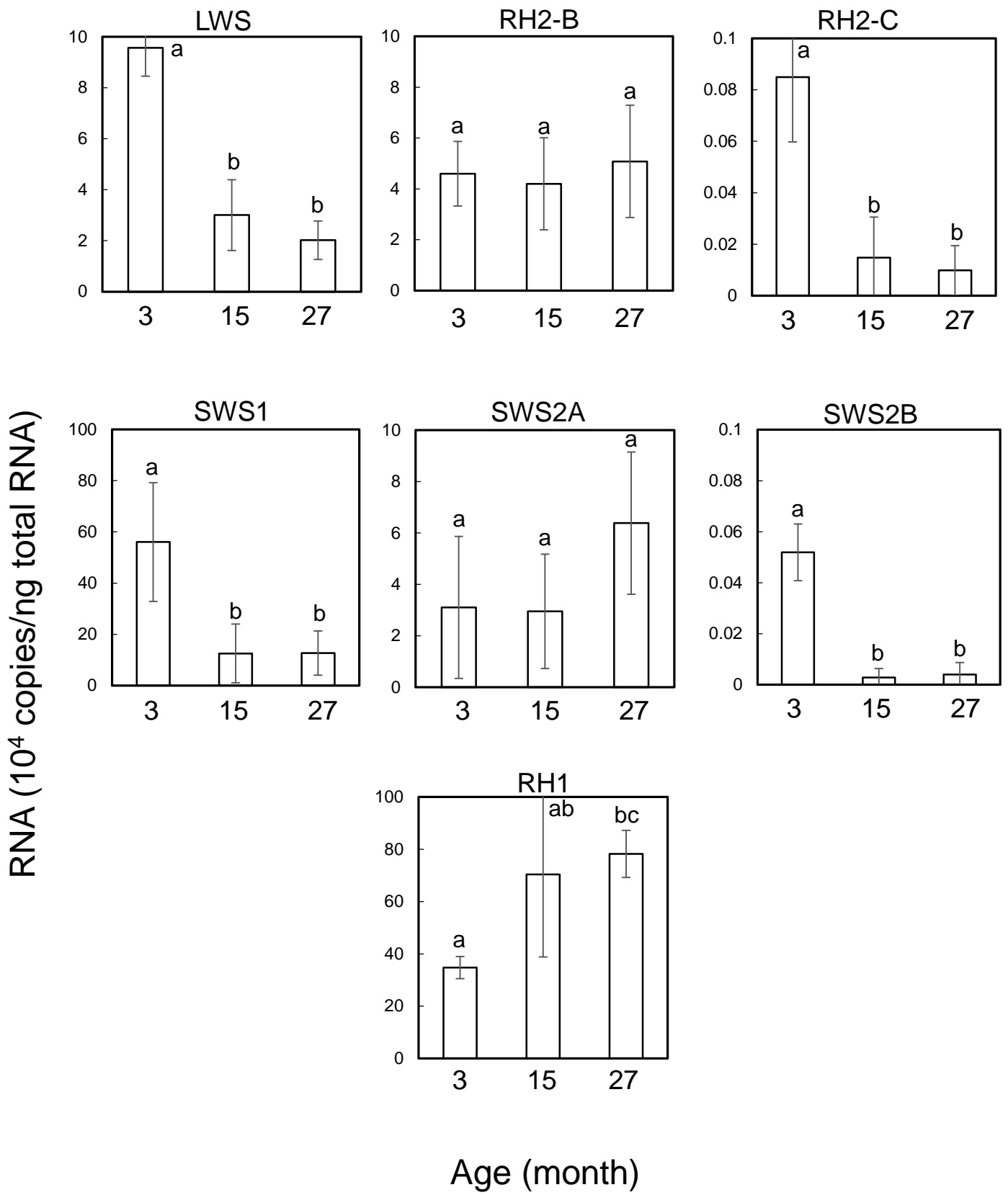


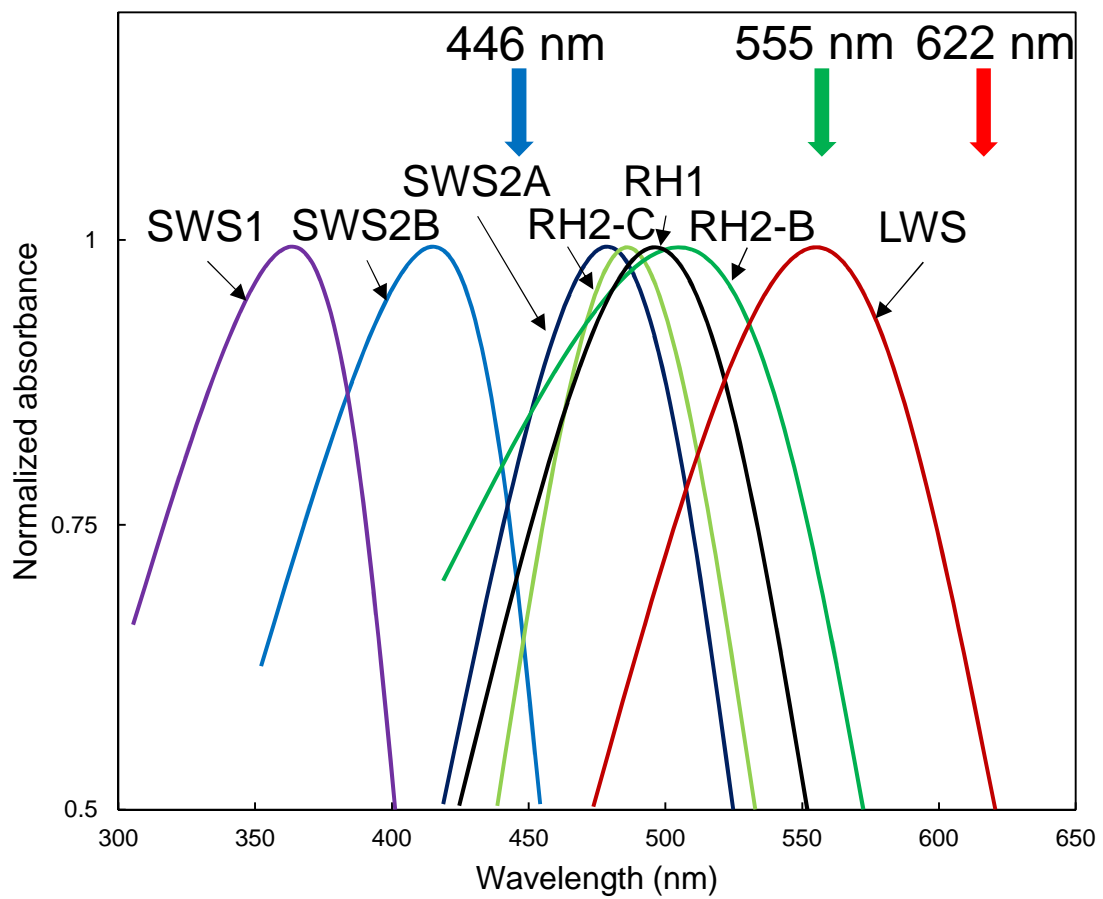
| | | | | | | |
|--------------|--|---------|-------------|---------|-------------|-----|
| bfRH2-A | MENGTEGQNFYIPMNNRTGLVRSPYEY | TQY* | Laapwqfklla | ymfflic | tgfpinaltl | 60 |
| Medaka RH2-A | MENGTEGKNFYIPMNNRTGLVRSPYEY | PQYYLAD | PWQFKLLGI | YMFFLI | LTGFPINALTL | 60 |
| bfRH2-A | Lvtagnkklrqplnfilvnlavaglimvcfgftvafysslmgfyf | lpgm | gcaveg | matl | | 120 |
| medaka RH2-A | VVTAQNKCLRQPLNFILVNLAVAGLIMVCFGFTVCIYSCMVGYFSLGPLGCTIEGFMATL | | | | | 120 |
| bfRH2-A | ggqvsllwslvvlaieryvvvckpmsgsfkftsthaatgcaftwimaascaipplvgwsryi | | | | | 180 |
| medaka RH2-A | GGQVSLWSLVVLAIERYIVVCKPMGSFKFTATHSAAGCAFTWIMASSCAVPPLVGWSRYI | | | | | 180 |
| bfRH2-A | pegiqvscgpdyytmagpynnesfvymftchfcvfvftiffitygnlvctvkaaaaqqqd | | | | | 240 |
| medaka RH2-A | PEGIQVSCGPDYYTLAPGFNNEFVVMYMFTHCFVFPVFTIFFTYGSLVMTVKAAAQQQD | | | | | 240 |
| bfRH2-A | sastqkaekevtrmcilmvlgflvawtpyasfaawiffnkgaafspiamaipffsktsa | | | | | 300 |
| medaka RH2-A | SASTQKAEKEVTRMCELMVLGFLVAVPYASYAAWIFFNRGAAFSAMSMaipFFSKSSA | | | | | 300 |
| bfRH2-A | lfnpiiyvllnkqfrncmlttvgmgmvedetsvstsktevs | svs | | | | 346 |
| medaka RH2-A | LFNPIIYILLNKQFRNCMLATIGMGMVEDETSVSTSKTEVSTAA | | | | | 346 |



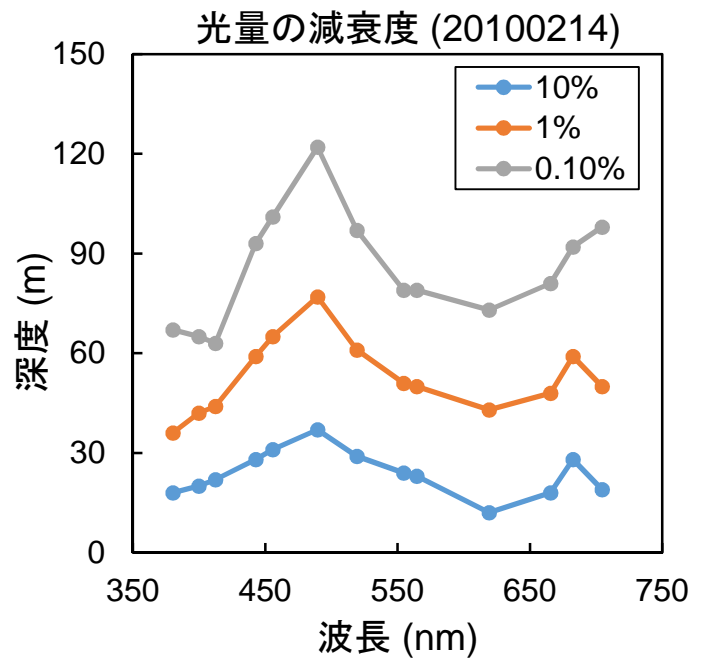
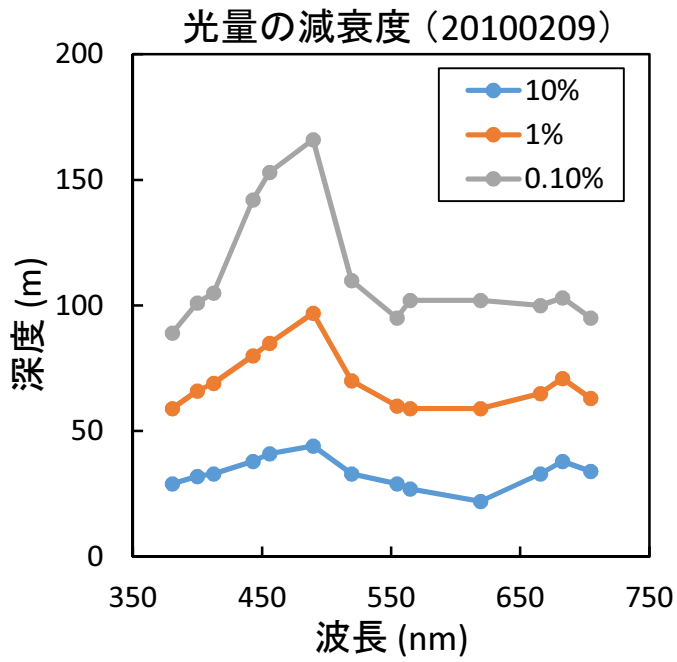


☒ 1-4



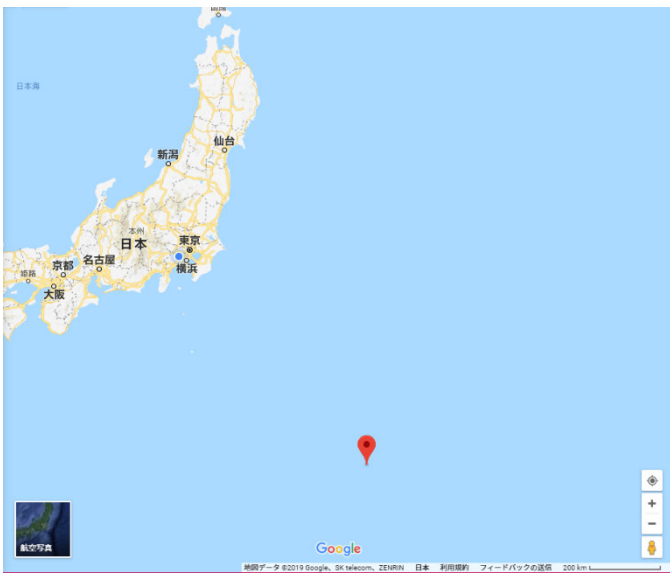


A



B

0209測定点: 30N, 145E



0214測定点: 47N, 160E

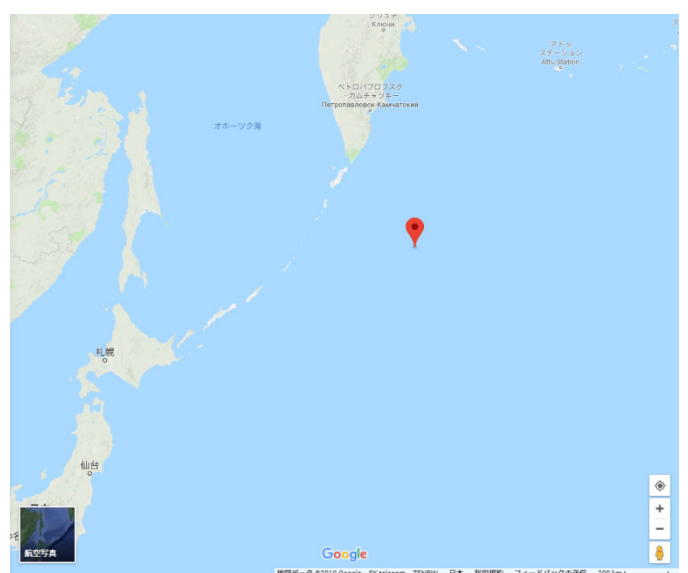


図 1-7

表 2-1 cDNAクローニングに用いたPCR用オリゴDNAプライマー

| 遺伝子 | | 塩基配列 | |
|--------------|------------------|--|-------------------------|
| LWS | PCR-forward | ACTGTTGAGGGCTCTCCTGC | |
| | PCR-reverse | CCCCCAAATTAGAGAACATGGAG | |
| RH2-A | PCR-forward | CAATTCAATCCTAACTAAGCAAAG | |
| | PCR-reverse | TGTTGGGAATGGTCTGTGT | |
| | Internal-forward | CTGGCTTCCCCATCAACGCTCT | |
| | Internal-reverse | TGGTCAGCATGCAGTTACGGAACT | |
| | Inverse-reverse | AGGAGGAATAGCGCAGGAGG | |
| | Inverse-forward | GTCATTCGTCTTGTTTCATGTTACCTG | |
| | Mac-full-forward | ATGGAGAACGGCACAGAGGGCCAGAA | |
| | Mac-full-reverse | TTAGGAAACAGAGGACACTTCTGTCTTGCTGG | |
| | RH2-B/C | PCR-forward | ATGTCTTGGGACGGAGGAATCGA |
| | | PCR-reverse | ACACAGAGGACACCTCTGTCT |
| 5'RACE-Rev | | AGAATCTTGTACATGATGTGATCCA | |
| 3'RACE-For | | GTACCATATGCCACTTTCGCCGC | |
| Pol-full-for | | GCTCCAGCGAAGGTGAACGGA | |
| Pol-full-rev | | GAGACAGTGGAAAGGAAAATGTCCAGG | |
| SWS2A | PCR-forward | CTTGTTTGCCCGTGGGGGAAA | |
| | PCR-reverse | CTGTGGAAAACGTTGTGGATGTTTCAG | |
| | pMT-forward | GTACGAGAA <i>TTCCACCATGA</i> AAGCACGGCCGGGT | |
| | pMT-reverse | TGGTTC <i>GTGACGCAGGCCCA</i> ACTTTGGAGACTTCGG | |
| SWS2B | PCR-forward | CATTTGACAAACAACCAGAGG | |
| | PCR-reverse | CTTTCAGTGCTATTTACTCTATG | |
| SWS1 | PCR-forward | CATGGGGAGAAAGCTCAGGTTC | |
| | PCR-reverse | CATCCGACATCACTTCTAATTTGTTCAAACA | |
| RH1 | PCR-forward | CGCAAACCGCAAGCCGCAA | |
| | PCR-reverse | CATGGAGCCTTTGTAAATGGCCCT | |

pMT プライマーについて、*EcoR* I および *Sal* I 配列は斜体で、開始コドンは下線付きで示した。

表2-2 人工点変異導入に用いたオリゴDNAプライマー

| 用途 | アミノ酸変異 | | 塩基配列 | |
|--------------------|------------------|-----------|---|--|
| カレイ科祖先の作出 | 39S | Sense | CCATCTAGCA <u>AG</u> CTCAGGCACCT | |
| | | Antisense | AGGTGCCTGAGCTT <u>G</u> CTAGATGG | |
| | 46M | Sense | CACCTTCTACGCC <u>AT</u> GGCCATATACATGT | |
| | | Antisense | ACATGTATATGGCC <u>AT</u> GGCGTAGAAGGTG | |
| | 62A | Sense | ACTAGCATCAAT <u>GCA</u> CTCACCATCCTG | |
| | | Antisense | CAGGATGGTGAGT <u>GCA</u> TTGATGCTAGT | |
| | 254R | Sense | GAAGGCAGAG <u>AGG</u> GAGGTGACCAG | |
| | | Antisense | CTGGTCACCT <u>CC</u> CTCTCTGCCTTC | |
| | 272L, 275A, 276S | Sense | TGCTGGTTGCCCTAC <u>GCTTC</u> TTTGCC | |
| | | Antisense | GGCAA <u>AGGAAG</u> CGTAGGG <u>CA</u> ACCAGCA | |
| | 293L | Sense | TTCGACCTGAGAT <u>TGG</u> CTACTATCCCA | |
| | | Antisense | TGGGATAGTAG <u>CCA</u> ATCTCAGGTCGAA | |
| | カレイ目祖先の作出 | 56V | Sense | TTTTTTATATTTGTTT <u>TGG</u> GCACTAGCATCAAC |
| | | | Antisense | GTTGATGCTAGTGCC <u>CAA</u> AACAATATAAAAAA |
| 69V | | Sense | ATCGTGTGCACCGT <u>G</u> AAATACAAGAAG | |
| | | Antisense | CTTCTTGTATTT <u>CAC</u> GGTGCACACGAT | |
| 106C | | Sense | TGCTGCGCATTTT <u>CATGC</u> AGATATTTTATC | |
| | | Antisense | GATAAAATATCT <u>GCA</u> TGAAAATGCGCAGCA | |
| 230S | | Sense | ATCTTCTGCTACT <u>CA</u> CAGCTGCTCATC | |
| | | Antisense | GATGAGCAGCTGT <u>GAG</u> TAGCAGAAGAT | |
| 296I | | Sense | AGATTGGCTACTAT <u>CCC</u> AGCTGTCTTC | |
| | | Antisense | GAAGACAGCTGGG <u>AT</u> AGTAGCCAATCT | |
| 335E | | Sense | GGTGGAGGTGATGAT <u>GAA</u> GAATCTTCAACA | |
| | | Antisense | TGTTGAAGATT <u>CTTC</u> ATCATCACCTCCACC | |
| カレイ科祖先～ マツカワ属祖先 | | 275T | Sense | TGGTTGCCCTAC <u>ACT</u> TCCTTTGCCCTT |
| | | | Antisense | AAGGGCAAAGGA <u>AGT</u> GTAGGGCAACCA |
| | 275A | Sense | TGGGCGCCCTAC <u>GCT</u> ACCTTTGCCCTT | |
| | | Antisense | AAGGGCAAAGGT <u>AGC</u> GTAGGGCGCCCA | |

導入すべき変異(コドン)を下線で示した。

表2-3 カレイ目魚種のオプシン遺伝子

| type | subtype | <i>V. moseri</i> | <i>V. variegatus</i> | <i>M. achne</i> | <i>P. olivaceus</i> |
|-------------|---------|------------------|----------------------|-----------------|---------------------|
| | | mRNA 発現および遺伝子の存在 | | | |
| LWS | LWS | + | + | + | + |
| RH2 | RH2-A | - / +* | - | - / + | - / + |
| | RH2-B | + | + | + | + |
| | RH2-C | + | + | - | + |
| SWS2 | SWS2A | + | + | + | + |
| | SWS2B | + | + | + | + |
| SWS1 | SWS1 | + | + | + | + |
| RH1 | RH1 | + | + | + | + |

+: ゲノム中に遺伝子が存在しmRNAが眼球で発現、- / +: 遺伝子は存在するが眼球でmRNA発現が確認されなかった、-: 遺伝子が存在しない。*: マツカワRH2-A は偽遺伝子であった。マツカワのデータはKasagi et al., 2015（第一章を参照）。

表2-4 カレイ目視覚オプシンの枝モデルによるアミノ酸推移の比較

| オプシン | 1 ω モデル | | マルチ ω モデル | | | 尤度比検定 | | |
|--------------|----------------|---------|---------------------------------------|--|--|---------|--------------|--------------------|
| | ω | lnL | $\omega_1, \omega_2, \dots, \omega_5$ | | | lnL | Δ lnL | p (χ^2 test) |
| LWS | 0.146 | -1654.4 | 0.0001, 999, 0.0001, 999, 0.130 | | | -1651.2 | 6.489 | 0.166 |
| RH2-A | 0.186 | -2347.6 | 0.172, 0.299, 0.21, 0.151, 0.144 | | | -2346.3 | 2.547 | 0.636 |
| RH2-B | 0.250 | -1846.4 | 0.199, 0.311, 0.0001, 0.406, 0.174 | | | -1844.5 | 3.789 | 0.435 |
| RH2-C | 0.147 | -1814.5 | 0.809, 0.182, 0.136 | | | -1813.6 | 1.674 | 0.433 |
| SWS2A | 0.344 | -1951.7 | 0.309, 999, 0.0001, 0.659, 0.194 | | | -1946.7 | 9.963 | 0.041* |
| SWS2B | 0.248 | -1786.5 | 0.443, 0.0001, 0.160, 0.787, 0.173 | | | -1783.6 | 5.734 | 0.220 |
| SWS1 | 0.215 | -1657.5 | 0.343, 1.190, 0.0001, 0.257, 0.075 | | | -1651.8 | 11.304 | 0.023* |
| RH1 | 0.240 | -1836.8 | 0.400, 0.278, 0.0001, 0.505, 0.167 | | | -1833.4 | 6.754 | 0.150 |

$\omega_1, \omega_2, \dots, \omega_5$ は各系統間の枝に対応する (2.4.7節参照)。 $\omega = 0.0001$ は dS変異が枝中になく、 $\omega = 999$ は枝中にdS変異しかないことを示す。

表2-5 棘鰭上目SWS2Aの λ_{\max} に影響を与えると考えられる波長調節アミノ酸残基の比較

| Tuning site | <i>V. moseri</i> | <i>V. variegatus</i> | <i>M. achne</i> | <i>P. olivaceus</i> |
|-----------------------|------------------|----------------------|-----------------|---------------------|
| λ_{\max} (nm) | 482.3 | 485.4 | 451.9 | 465.6 |
| 52 | F | F | F | F |
| 55 | V | V | V | V |
| 58 | T | T | T | T |
| 99 | V | V | V | V |
| 100 | G | G | A | G |
| 122 | M | M | L | M |
| 124 | T | T | T | T |
| 170 | A | A | A | A |
| 213 | L | L | L | L |
| 275 | T | T | A | A |
| 301 | S | S | S | S |

波長調節アミノ酸残基はNakamura et al., 2013を参考にした。アミノ酸残基の番号はカレイ目SWS2Aに準拠する。種間で異なる残基を太字で示す。

表2-6 祖先型SWS2Aの λ_{\max} に対するアミノ酸置換の効果

| | 変異 | λ_{\max} (nm) | カレイ科祖先からの $\Delta\lambda_{\max}$ (nm) |
|---------|---|-----------------------|--|
| カレイ科祖先 | - | 462.4 | - |
| | A275T | 479.0 | + 16.6 |
| | S39T, M46I, A62T, R254K, L272A, S276T, L293F | 469.6 | + 7.2 |
| マツカワ属祖先 | 上記全て | 482.3 | + 19.9 |

表2-7 カレイ目SWS2Aオプシンのサイトモデルによる正淘汰の検出

| モデル | ω の分布 | ω の値 | lnL | 尤度比検定 | | |
|-----|--|---|---------|--------------|-----|-----------------|
| | | | | Δ lnL | 自由度 | χ^2 test |
| 7 | β 分布 ($0 < \omega_1 < 1$) | $\omega = 0.375$ | -1946.1 | 2.05 | 2 | Not significant |
| 8 | β 分布+1 ($0 < \omega_1 < 1$) ($\omega_2 > 1$) | $\omega_1 = 0.473$ $\omega_2 = 16.6$ [$p > 0.98$, サイト106] | -1944.1 | | | |

尤度比検定：モデル7またはモデル8に従って推定した場合の尤度比を検定した結果。尤度比は $2 \times \Delta \ln L = 4.1$ 、自由度2の χ^2 分布の5%水準値は5.99。

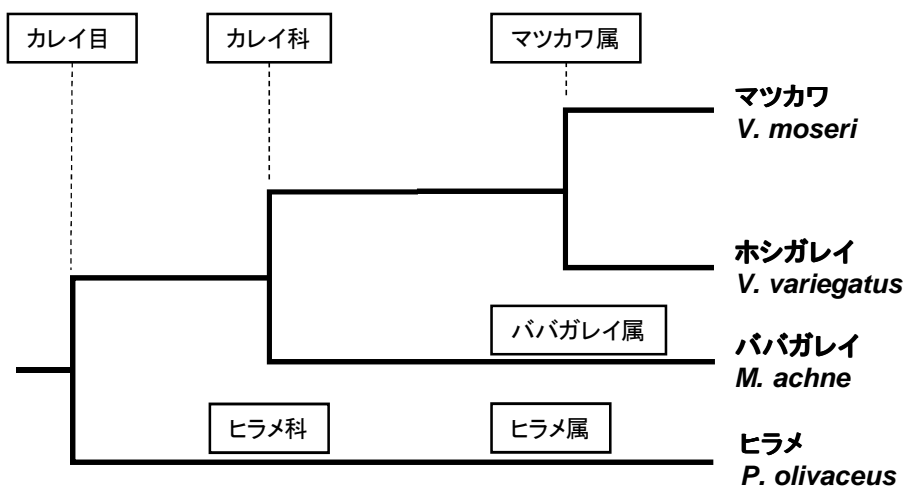
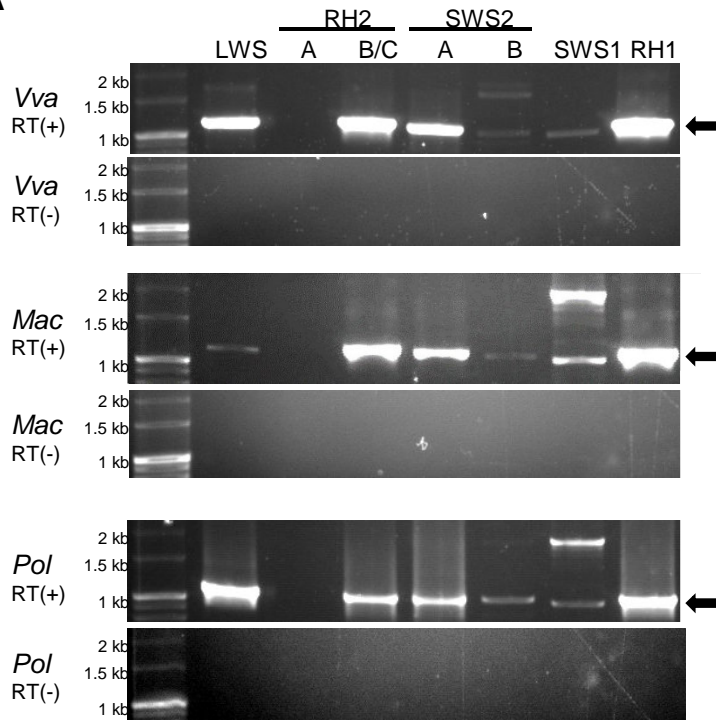
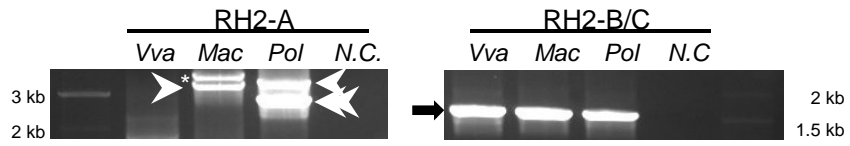


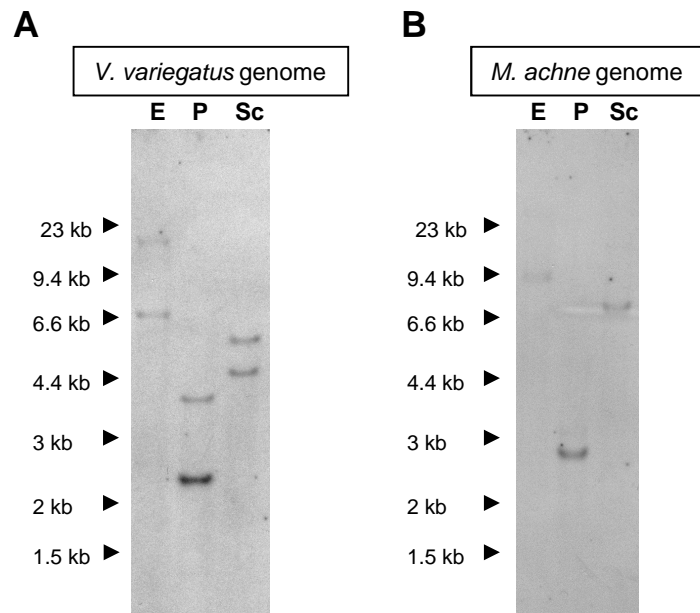
図 2-1

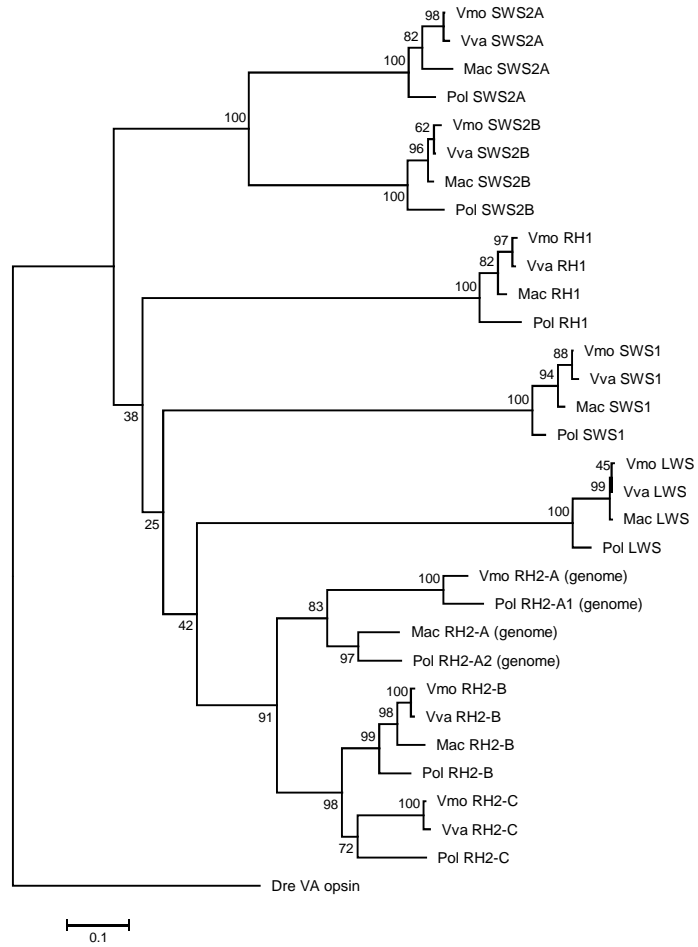
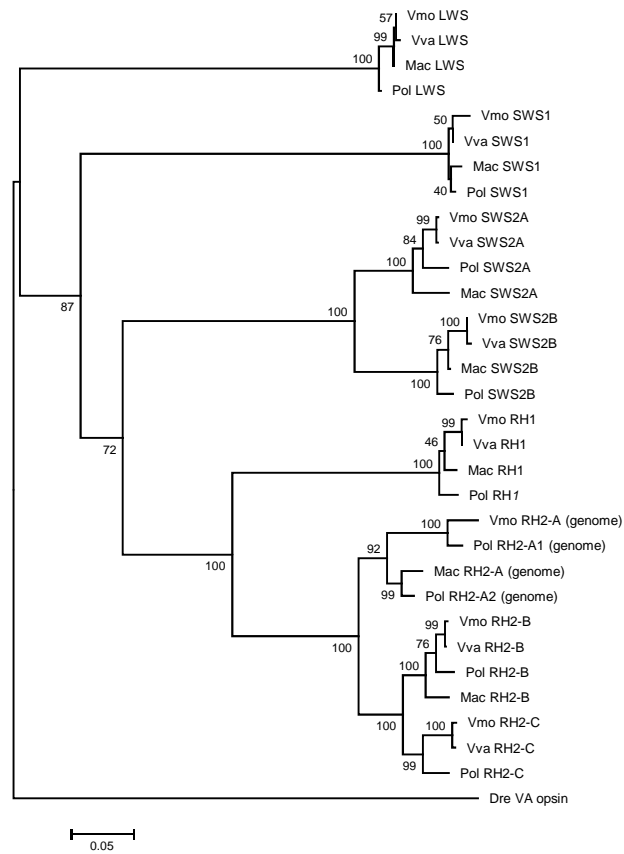
A

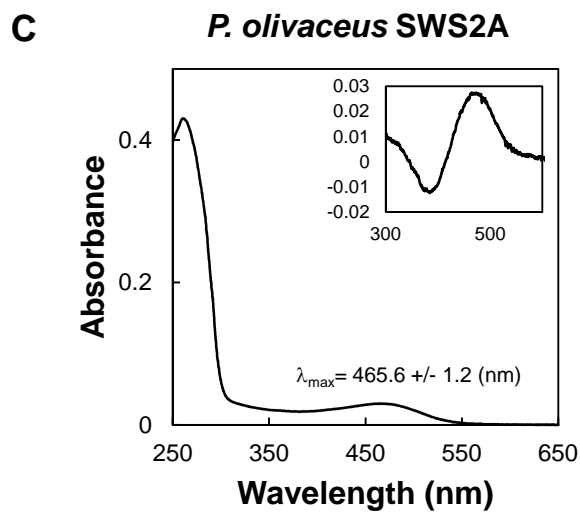
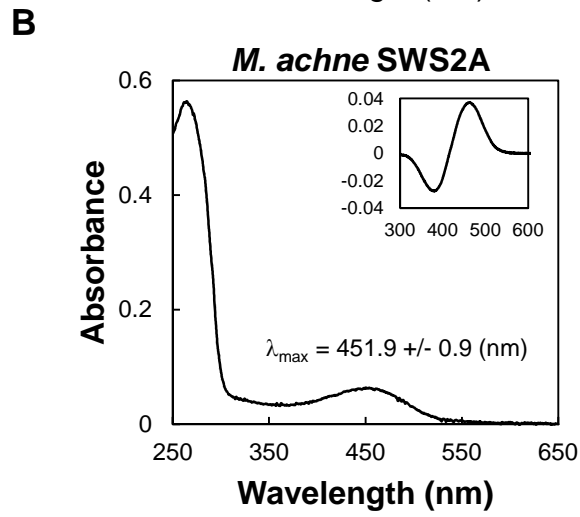
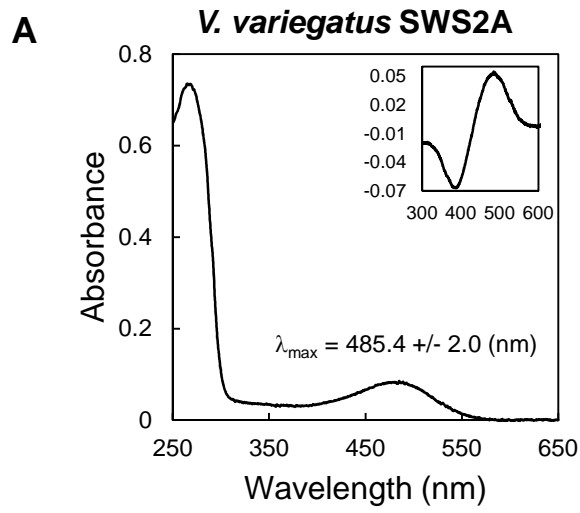


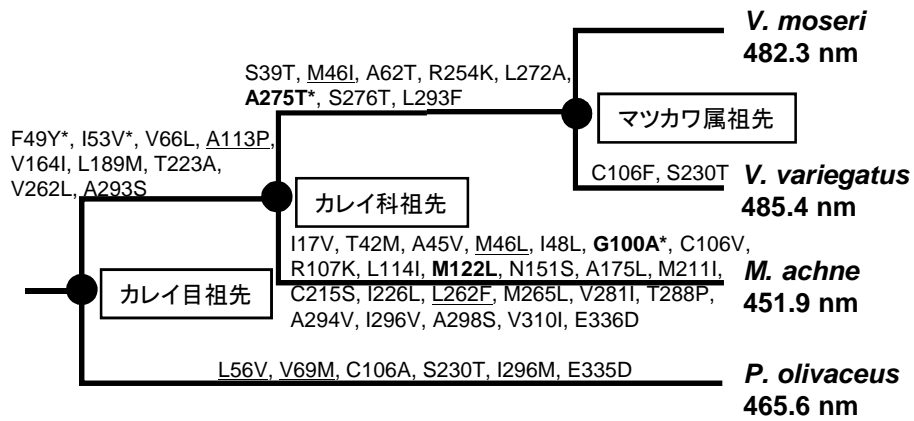
B

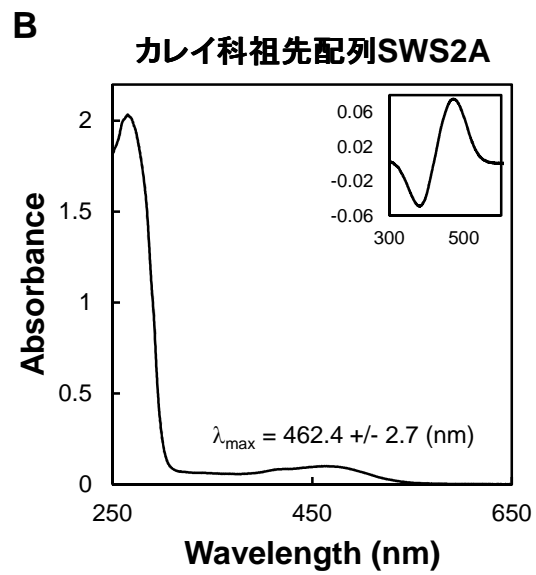
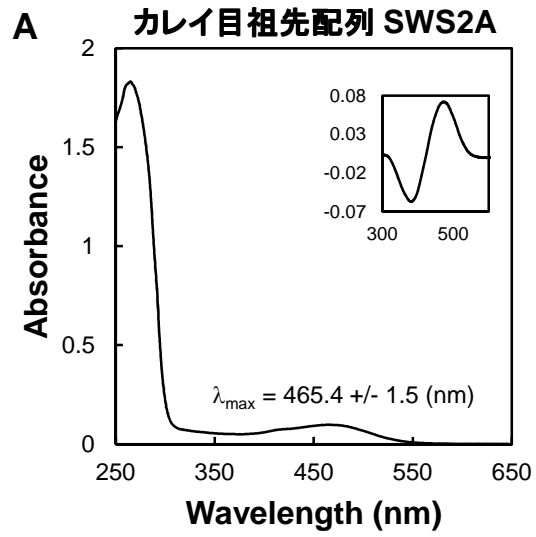


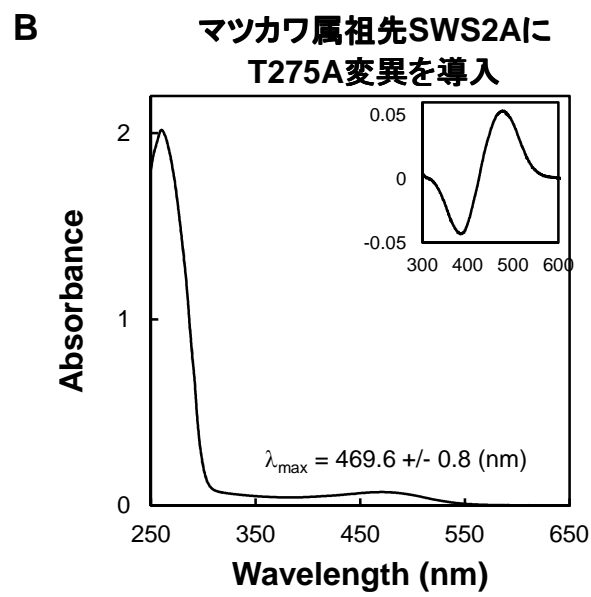
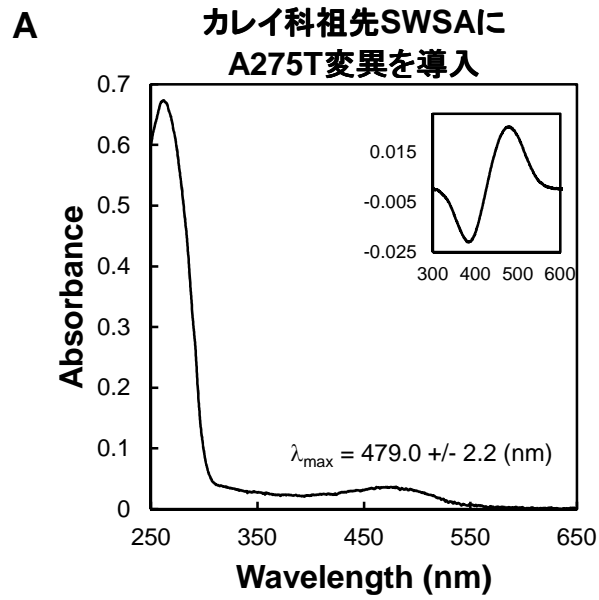


A**B**



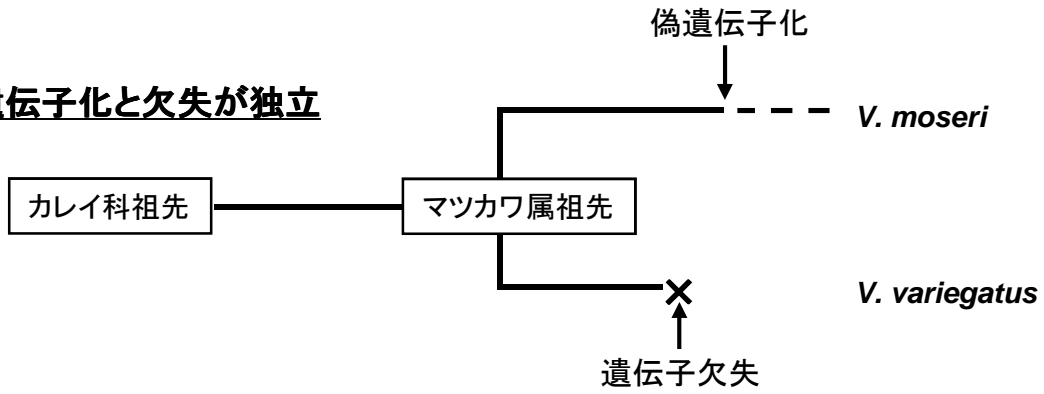




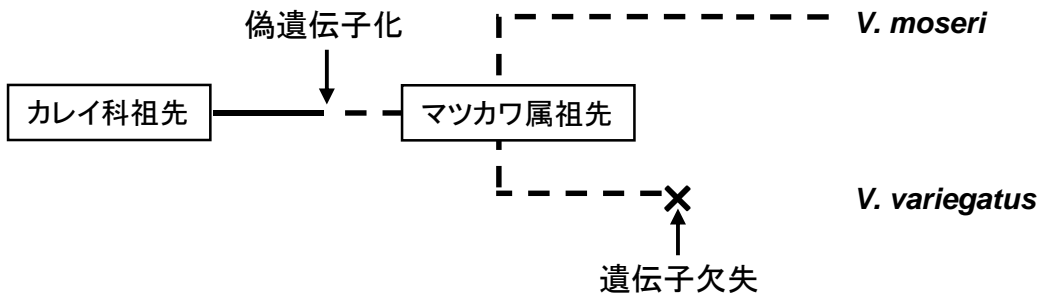


A: RH2-A

①偽遺伝子化と欠失が独立



②偽遺伝子化は共通、欠失は独立



B: SWS2A

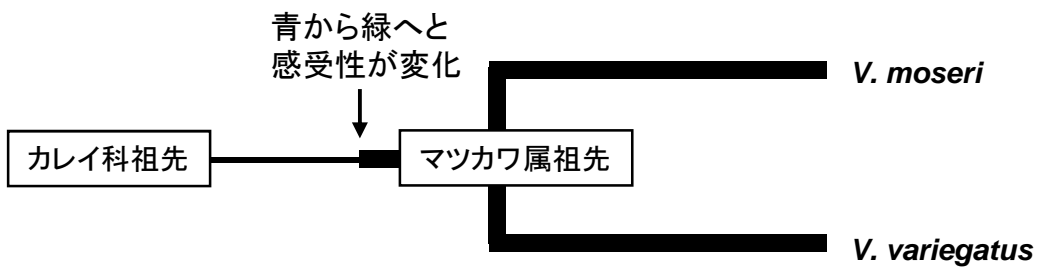


表 3-1 cDNAクローニングおよび視物質再構成用発現コンストラクト作製に用いたオリゴDNAプライマー一覧

| 遺伝子 | | 塩基配列 |
|----------|------------------|--|
| エクソロドプシン | Internal forward | ATGAATGGCACAGAAGGACTCGACTTTTA |
| | Internal reverse | TCAAGCGGGGGCCACCTGGC |
| | 3' RACE-1 | CCCGGTGTTTCATGACGGCACCGGCCTT |
| | 3' RACE-2 | CATGACGGCACCGGCCTTCTTCGCAA |
| | 5' RACE | CTTCAATGTTGCAGCCGCTGACCCCTAAGA |
| | External forward | AAAAACATCACCGTCAGCAGCCATG |
| | External reverse | GGTGGCGGTGTGGGCAGGTCA |
| | pMT5 forward | ACTCGAGAATTCCACCATG <u>GAATGGCACAGAAGG</u> |
| | pMT5 reverse | TCAAGTGT <u>CGACGTGGGGGGCCACCTGGCTGGT</u> |
| VALオプシン | Internal forward | ATGGATTCTCCGAGCCTGTCCGT |
| | Internal reverse | TTACATTGGACACACTTTGTTCTCTGGGAT |
| | 3' RACE | GACCTCTGAGCGACCAGGAATTACCGCAGA |
| | 5' RACE-1 | GGTGACCACGAACATGAGCACCGCCAGGA |
| | 5' RACE-2 | CAGGATGGTGAAGTTCCACGGCGCGATGT |
| | External forward | AGCCGGACAGTCCGGGGACG |
| | External reverse | AGGGTCAAAAAACAGACACCTATTGGGTGTG |
| | pMT5 forward | AGAACAGAATTCCACCATGGATACTCTGAGCCT |
| | pMT5 reverse | GGTTGGGT <u>CGACATTGGACACACTTTGTTCTC</u> |
| パラピノプシン1 | Internal forward | GGGCTTTGCTGTTGCCTTCTTTGGTAT |
| | Internal reverse | GATGGGGTTGTAGACAGTGCTGCTCTT |
| | 3' RACE | AAGCTGCAGGTATCTGAGGCTGGGAGGAC |
| | 5' RACE-1 | ACGGAGAGTCCACAAGAGACGGGAGTAGGACA |
| | 5' RACE-2 | CTGGTCTGGAACAGGACGGCGCTCAT |
| | External forward | GAATGGCTTCACAATACTGGCCGTTATC |
| | External reverse | AGCCCACGGTGCATTTCATACATTCTT |
| | pMT5 forward | ACTCGAGAATTCCACCATGGGGTGTTTTTTCTGC |
| | pMT5 reverse | ACTGAAGT <u>CGACTCTTTTAAAGATTGTTTAGG</u> |
| パラピノプシン2 | Internal forward | GGCTTCATCATTCTCTCCGTCATTATGGCTCT |
| | Internal reverse | GAAGGGCACAGCGTACTTACGGAAGTGGTTGT |
| | 3' RACE | Internal forwardと同一 |
| | 5' RACE | GGTTCAGGTGAGCGACCACAGCCAG |
| | External forward | TATCTGACCACTTTTTAAAAACCTCTGCATCC |
| | External reverse | CACAAATGTTTTCAATTTGTAAATGTGTTGGCTCT |
| | pMT5 forward | ACTCGAGAATTCCACCATGCAGCCGTCTTACTT |
| | pMT5 reverse | ACTGAAGT <u>CGACGGAGATACTTTGCTCGTCGC</u> |

pMT プライマーについて、*EcoR* I および *Sal* I 配列は斜体で、開始コドンは下線付きで示した。

表 3-1 cDNAクローニングおよび視物質再構成用発現コンストラクト作製に用いたオリゴDNAプライマー一覧(続き)

| 遺伝子 | | 塩基配列 | |
|------------------|------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| バリエトブシン | Internal forward | CCTGGCCGTGTCCGACCTCATGAT | |
| | Internal reverse | GGCTGGTCTTGGCAAAGTACATTGGCA | |
| | 3' RACE-1 | TGTTTGCTGGCTGCCCTACACGGCGTT | |
| | 3' RACE-2 | TGTGGACCCCGAGCTCTACATCCCTCCACT | |
| | 5' RACE | CAAATCCTTGAAACACACAGGCCGTGTGGCCAA | |
| | External forward | GCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAG | |
| | External reverse | CACCGACATTCGACAGTGGAGACAG | |
| | pMT5 forward | AGAACAGAATTCCACCATGGACAGCAACAGCAC | |
| | pMT5 reverse | GGTTGGGTCGACCAGAGGCCAAAACCCTGCATT | |
| | TMTオブシン | Internal forward | CCGTTCAGCTTCGCGGCCAG |
| Internal reverse | | GACAGAAGACAAACAGACACACGATGTAGG | |
| 5' RACE | | TGGTACGGCTTCGCCAACTCTCTCTTTGGTAT | |
| 3' RACE | | GTGGTCCCAGGACCCTCAGGGCCGTATT | |
| External forward | | GCCGTTGACACCGGACTGCG | |
| External reverse | | TGGCTATAGCCATTTAAAAAGTCCACAATCA | |
| pMT5 forward | | ACTCGAGAATTCCACCATGATCTTGTCCAACGT | |
| pMT5 reverse | | TTCAGTGTCGACCCATCAAAGTGGGCCACTAG | |
| Opn3 | | Internal forward | CGTTCTCCCACCAATTTGTTACTGGTCAACAT |
| | | Internal reverse | ACTGGTGATGATGAAGACTATGGACGAGG |
| | 3' RACE | CCATCCGGCCAATCGTTGTGTCCCGCAC | |
| | 5' RACE | CACACGCACGTCGCATGGCTCCAGA | |
| | External forward | GGACCAGAGTTGGAGAGTTCACGCA | |
| | External reverse | GTGGGGTCAAAAAGTCCAGTCCTTGTGGA | |
| Opn5 | Internal forward | ATGGCGGTGATGGGAAATGAGACGTG | |
| | Internal reverse | TCATATCTCGATTTGAGCTTCTTTGGCAG | |
| | 3' RACE-1 | CGTCATTCCCACCTTGCTGGCCAAGTCCTC | |
| | 3' RACE-2 | CTGGCCAAGTCCTCAGCCATGTACAACCCCAT | |
| | 5' RACE | AGTCATGAGCTCAGGAGGCCTTAACTTGGTCT | |
| | External forward | AACTGTGTTTCGCTATGACCGATGTCC | |
| | External reverse | GAGGTCCCACAGTCTAAAGCATCTGTC | |

pMT プライマーについて、*EcoR* I および *Sal* I 配列は斜体で、開始コドンは下線付きで示した。

表 3-1 cDNAクローニングおよび視物質再構成用発現コンストラクト作製に用いたオリゴDNAプライマー一覧(続き)

| 遺伝子 | | 塩基配列 |
|--------|------------------|-------------------------------------|
| Opn4m1 | Internal forward | ATGGTGCCCAAGTACACGTACCCCTT |
| | Internal reverse | GCCCTGCCCCCCTGTTGCTGT |
| | 3' RACE | GGCACGCTCAGTCGAATCCCGAGCAT |
| | 5' RACE | GCACATCAGCAGGTCTGTGATCGCCAGGT |
| | External forward | TTCCCGTTTATTCTCCAGAGGTGGCA |
| | External reverse | CAGGTCATTGGCTGCTGGAGTTAGT |
| Opn4m2 | Internal forward | CCTGGAACATCAGCTCCATCAGTCCGCA |
| | Internal reverse | GGGGGACTGTGCAGTATAGACGGGCTGGATA |
| | 3' RACE | AGGAGAGTTTGAGAGAACGGCCGCCACAA |
| | 5' RACE | ACCAAACAGGGCTCCGCAGAAGGCATACAAC |
| | External forward | CAGCAACCACCGTGGACTGGTG |
| | External reverse | AATACTGTTTCACAAACACTTGTACACACACAT |
| Opn4x1 | Internal forward | GTGGATCGTGGATTCTATCGGCAGGTGGATGT |
| | Internal reverse | AATGATTTGTA CTCTTTGTCCCTCAGGGCTCCGA |
| | 3' RACE | TACGCCATCATCCACGCCAAATACAGGGACAC |
| | 5' RACE | GTGCACGAGGTCATCAGGCCCTCGGGAA |
| | External forward | GGGGCTTCACTCTCTGGCTAAGAA |
| | External reverse | TGGTGGTCAAATCCATTCAGTGGGCC |
| Opn4x2 | Internal forward | AGCCTGAGAAAGCACACACCCAGAGCAG |
| | Internal reverse | CTCAATGCTGTCCTCCATGCACACGCTGT |
| | 3' RACE | AGGTCCTATAAGAAACAATTGGAGCGGAAAGCAAC |
| | 5' RACE | GCCATGAGGAAGTCGCTGACCGCCA |
| | External forward | CCGGTCCTGATGAGGTGTCTGAG |
| | External reverse | CACAAGGGTAAGTATTGAAGTCCAGCTC |
| B-アクチン | Forward | GAGCTGCGTGTTGCCCC |
| | Reverse | ACGGAGGATGGCATGGGG |

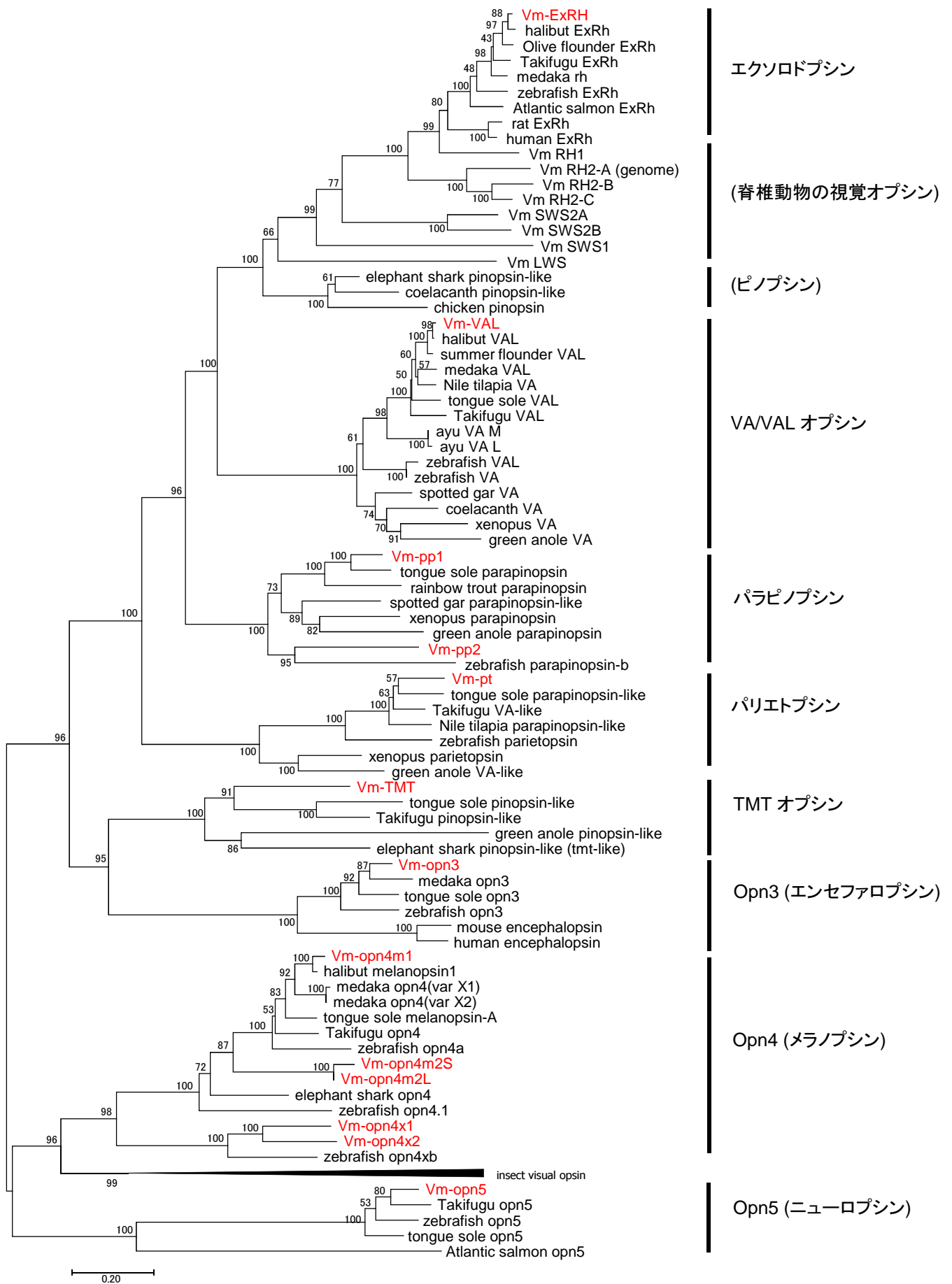


図 3-1

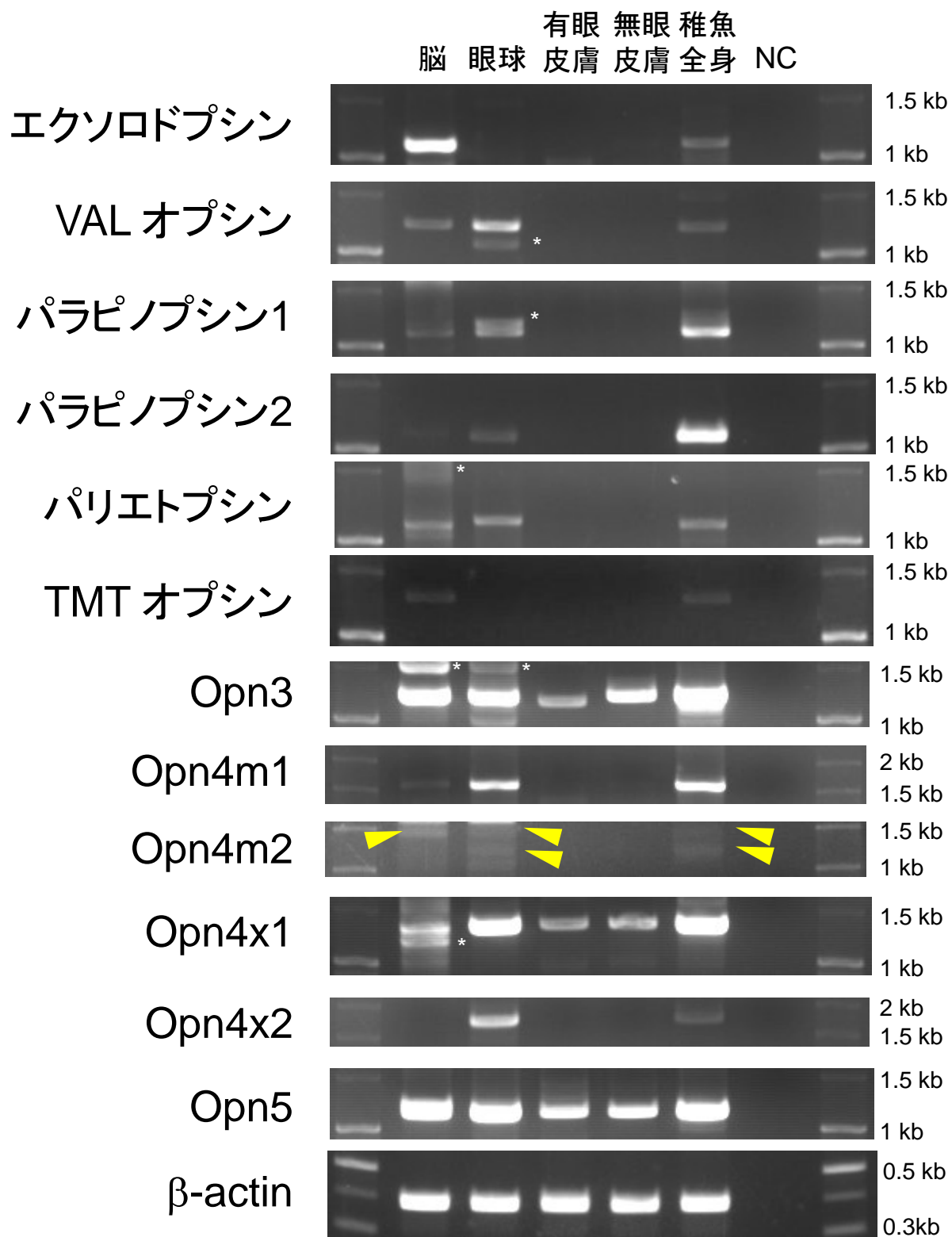


図 3-2

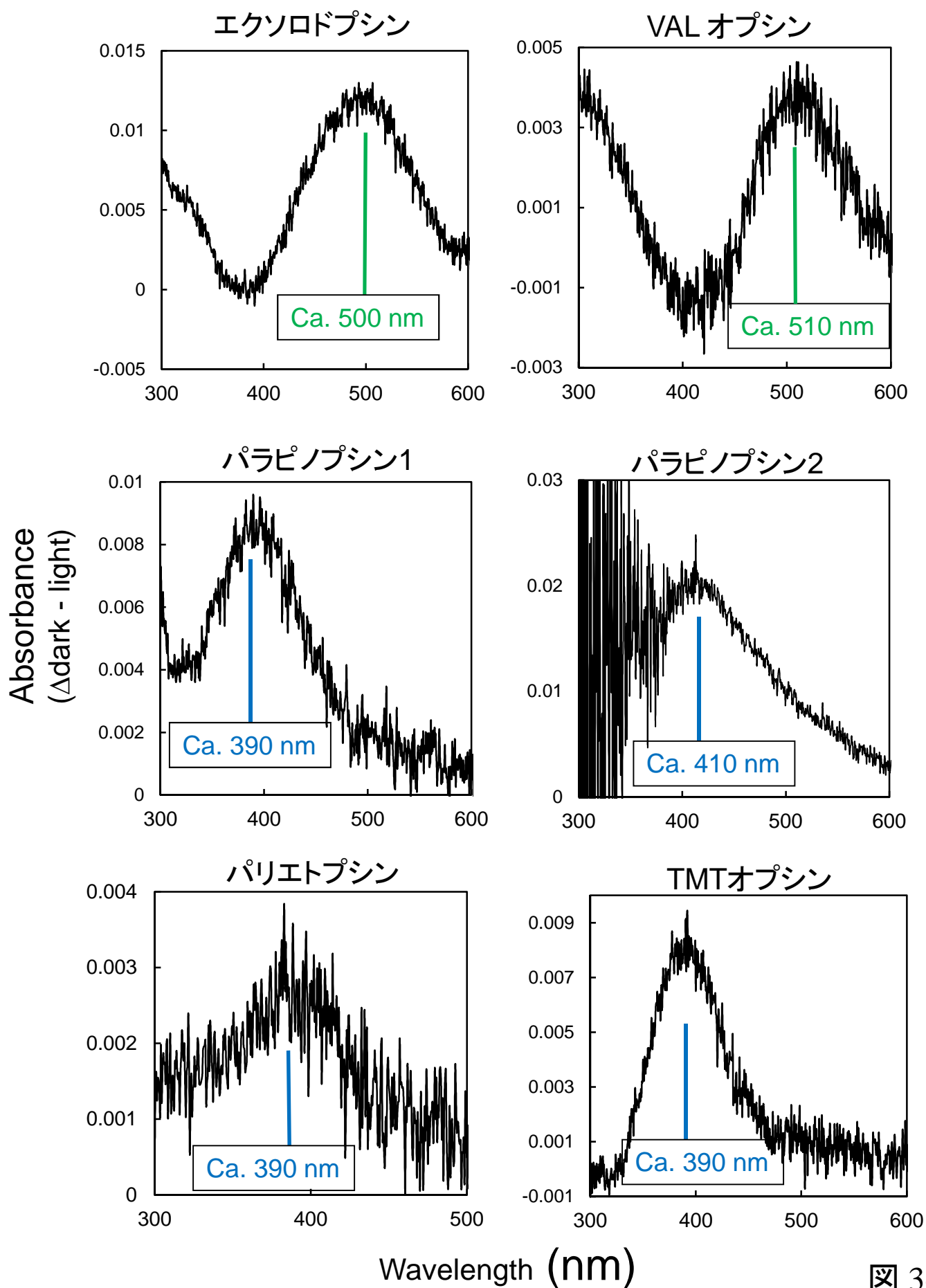


図 3-3