

## 新世界ザル Red-Green 視物質遺伝子と色覚の進化

河村 正二

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

### 1. はじめに

#### 1-1 色覚について

色覚とは光の波長の違いを認識する感覚のことである。食物、配偶対象、競合個体、捕食者、有害物といった様々な対象を検出し同定することに色覚は重要な役割を果たしていると考えられる。見られる側の色彩と見る側の色覚は互いに作用し合いながら進化してきたと考えられ、適応進化の1つの典型とみることができる。

色覚はまず光が眼球奥の網膜にある光受容細胞(視細胞)に吸収されることから始まる。視細胞は薄明視に重要な桿体と色覚に重要な錐体は大別される。どちらも外節と呼ばれる複雑な膜構造部分をもち、そこに実際に光を受容する物質である視物質がぎっしりと埋まっている。視物質は膜貫通タンパク質であるオプシンと光を吸収する発色団であるレチナールが共有結合した複合タンパク質である。哺乳類の場合レチナールは 11-*cis* 型 1 種類のみであり、これが光を吸収すると *all-trans* 型に異性化される。これがオプシンの構造変化を引き起こし、さらに一連の信号伝達系の活性化と視細胞の過分極を引き起こし、信号が脳に伝達され認識されるに至る。

ヒトの場合、錐体視細胞にいわゆる Red, Green, Blue の 3 種類があり、それらはそれぞれ約 560, 530, 420 nm を最大吸収波長 ( $\lambda_{\max}$ ) とする山型の吸収光特性をもっている。これらが様々な波長の光に対してそれぞれ異なった反応を

することで、脳で最終的に波長の弁別が行われ、色の感覚が生じる。ヒトはこれらの他に  $\lambda_{\max}$  約 500 nm の桿体視細胞をもつ。これら 4 細胞の吸収光特性の違いはそれらのもつ視物質の吸収光特性の違いによる。視物質の吸収光特性の違いは即ちオプシンの種類の違いによりもたらされる。オプシンのアミノ酸配列がもたらす物理化学的環境がレチナールの最も吸収しやすい波長を決定することになる。

ヒトの色覚は Red, Green, Blue の視物質による 3 色型である。これに対し多くの昼行性の非哺乳類脊椎動物には Red, Green, Blue, UV の視物質による 4 色型のもものが少なくない。一方、霊長類以外の哺乳類は Red (あるいは Green) と Blue による 2 色型 (いわゆる赤緑色盲) が大部分である。このように視物質のレパートリーと色覚は動物群によって大きく異なっている。

私は 1) こういった視物質のレパートリーはどのようにして進化してきたのか、そして 2) それによりもたらされた色覚がその動物の光環境にどのように適応しているのか、これらを明らかにしていくことが色覚進化の研究の究極的な目標と考えている。1) の問題は様々な動物で視物質遺伝子 (オプシン遺伝子) レパートリーがどのように生成したり消滅したりしてきたのか、そしてどのようなアミノ酸変化が  $\lambda_{\max}$  を変えてきたのか、さらに、どのようにして異なる視物質遺伝子がそれぞれ異なる視細胞で発現できるようになったの

か、を分子生物学的方法により明らかにすることにより検証していくことができる。それに対して2)の問題は分子生物学的方法のみでは解決できない問題であり、現時点ではアプローチの方法さえ暗中模索の状態にある。ここでは1)の観点から新世界ザルに関して行ってきた研究を報告し、2)の研究への展望についても考察する。

## 1-2 新世界ザルの色覚について

新世界ザルは色覚に非常に大きな種内及び種間変異をもつことで知られており (Jacobs, 1996), 全動物の中でも特異な存在である。典型的にはオスは2色型色覚 (赤緑色盲) であり, メスには2色型と3色型が混在している。さらに2色型, 3色型とも3種類ずつがあり, 合計6種類の異なる色覚が1つの種に混在している。これを視物質の観点でみると, オスはRed, Green, さらにその中間のYellowのうち1つを持つのに対して, メスはオス同様な個体と, これらのうちの2つをもつ個体がいる。Blueの視物質はどの個体にも共通に存在する。リスザル (*Saimiri sciureus*) を対象とした家系分析の結果, Red, Yellow, Greenの遺伝子はX染色体上にある1遺伝子座の3つの対立遺伝子であると考えられた (Jacobs and Neitz, 1987)。オスはX染色体を1本しかもたないため, 常染色体性のBlueと合わせて2種類しか錐体視物質をもてないが, メスは2本のX染色体をもつため, Blueと合わせて合計3つをもつことができる。X染色体がホモである場合オス同様に2色型になる。ヘテロの場合, X染色体のランダムな不活化 (ライオンゼーション) により, 1つの錐体視細胞中で発現するのは2つの対立遺伝子の一方だけであるため, 網膜全体では3種類の錐体視細胞が存在することになる。

これはRed-Green遺伝子の「X染色体1座位3対立遺伝子仮説」として知られ, 新世界ザルに一般的なパターンと考えられている (Jacobs, 1998)。ホエザル (*Alouatta*) とヨザル (*Aotus*) はこの例外として知られている。ホエザルは, ヒトをはじめとする狭鼻猿に類似して, RedとGreenをX染色体上の別々の座位にもち (Jacobs *et al.*,

1996 a), ヨザルは対立遺伝子の多型をもたずGreenのみであると考えられている (Jacobs *et al.*, 1993)。

ここで注意しなければならないのは「X染色体1座位3対立遺伝子仮説」が, 主として色覚と視物質の表現型の観察結果という状況証拠にのみ立脚しており, 未だ本格的なゲノムの解析がなされていない点である。コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) の家系分析ではこの仮説に対する疑念も表明されている (Travis *et al.*, 1988; Tovee *et al.*, 1992)。また, このように非常に興味深い色覚システムにも関わらず, これまでの新世界ザル視物質の $\lambda$  max測定値には測定間のばらつきがみられ, また測定値によっては無視できない誤差が含まれている。そこで, 本研究では1) コモンマーモセットを対象にした「X染色体1座位3対立遺伝子仮説」の実証と2) 視物質の正確な $\lambda$  maxの測定を行い, さらにヨザルとオマキザルを対象にして3) 1座位仮説が従来考えられていた程普遍的ではないことを明らかにした。

## 2. 材料と方法

### 2-1 動物試料

京都大学霊長類研究所の共同利用研究によりコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*), ヨザル (*Aotus trivirgatus*), フサオマキザル (*Cebus apella*) の血液あるいは凍結組織を得た。さらに, コモンマーモセットに関しては財団法人実験動物中央研究所動物実験センターの谷岡功邦博士より眼球及び臓器片の凍結サンプルを分与していただいた。

これらの試料より一般的なフェノール・クロロホルム抽出法により高分子ゲノムDNAを抽出した (Sambrook *et al.*, 1989)。また, 眼球サンプルを液体窒素下で破碎して網膜片を採取し, そこから全RNAをRNeasy RNA抽出キット (Qiagen社) を用いて抽出した。

### 2-2 ゲノムライブラリーのスクリーニング

コモンマーモセットのオス (No.50) とメス (No.116) 及びヨザルのオス (No.29) のゲノム

DNA をそれぞれのゲノムライブラリー作製に用いた。DNA は制限酵素 *Sau* 3AI で部分消化し、12-20 キロ塩基対 (kb) 長のを、ラムダファージベクター EMBL3 に連結し、*in vitro* パッケージング法によりライブラリーを作製した (Sambrook *et al.*, 1989)。

ヒトの Red 視物質遺伝子の全長 cDNA (Nathans *et al.*, 1986) をラジオアイソトープ [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP で標識し、プローブとして用いた。各ライブラリーとも約  $10^6$  個の組み換え体をスクリーニングに供した。ハイブリダイゼーションは  $6 \times \text{SSC} / 5 \times \text{Denhardt's} / 0.5\% \text{ SDS} / 5 \mu\text{g/ml}$  大腸菌 DNA 下  $55^\circ\text{C}$  で行い、 $1 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{ SDS}$  下  $55^\circ\text{C}$  で 4 回 (各 20 分) 洗いをを行った。これはプローブの塩基配列と約 30% 以下の相違を持つ DNA を検出する条件である (Sambrook *et al.*, 1989)。

得られたゲノム遺伝子クローンの制限酵素認識部位地図を作製し、プローブとのハイブリダイゼーションにより遺伝子のエクソンの位置を同定した。エクソンを含む領域を Bluescript SK (-) プラスミドベクターにサブクローニングし、塩基配列を決定した。塩基配列決定は LI-COR 4200 L-1 自動 DNA シークエンサーを用いて行った。

### 2-3 サザンハイブリダイゼーション

約  $3 \mu\text{g}$  のゲノム DNA を制限酵素で完全消化し、0.5% のアガロースゲルで電気泳動後、正電荷帯電ナイロン膜 (Biodyne B, Pall 社) に VacuGene 真空プロットティングシステム (Pharmacia 社) を用いて転写した。プローブ DNA の標識は 2-2 項と同様に行い、ハイブリダイゼーションと洗いは  $65^\circ\text{C}$  で 2-2 項と同様の溶液で行った。これはプローブの塩基配列と約 20% 以下の相違を持つ DNA を検出する条件である。

### 2-4 FISH

コモンマーモセットの染色体標本は植物性血球凝集素 PHA で細胞分裂を誘起した培養白血球から作製した。コモンマーモセットの Green 遺伝子のゲノムクローン ( $\lambda$  CJ 22) をビオチン-14-

dATP で標識し、染色体標本に対して Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を行った。 $37^\circ\text{C}$  で一晩ハイブリダイズ後、 $50\%$  ホルムアミド/ $2 \times \text{SSC}$  溶液中で 10 分 ( $37^\circ\text{C}$ )、 $1 \times \text{SSC}$  溶液中で 15 分 (室温) 洗いをを行った。ハイブリダイゼーションシグナルはウサギ抗ビオチン抗体と蛍光色素標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いて増幅した。詳しい方法論は Hirai ら (1994) を参照。

### 2-5 $\lambda$ max の測定

コモンマーモセットの Red, Yellow, Green, ヨザルの Green 遺伝子の全翻訳領域 cDNA を RT-PCR 法によりそれぞれの網膜 RNA から増幅単離した。用いたプライマーは次の通りである。

コモンマーモセット:

5'-AGGGCTGAATTCCACCATGGCCCAGCAGTGGAG-3' (センス)

5'-GGCAGAGTCGACGCAGGTGACACCGAGGACA-3' (アンチセンス)

ヨザル:

5'-AGGGCTGAATTCCACCATGGCCCAGCAGTGGAGCCT-3' (センス)

5'-GGCAGAGTCGACGCAGGTGACACGGAGGACAC-3' (アンチセンス)

cDNA はまず逆転写酵素を用いて  $42^\circ\text{C}$  で 30 分間合成させ、続いて  $92^\circ\text{C}$  45 秒、 $55^\circ\text{C}$  1 分、 $72^\circ\text{C}$  1.5 分 35 サイクルの PCR 反応で増幅させた。cDNA は Bluescript SK (-) プラスミドベクターにクローニングし、塩基配列を確認後、発現ベクター pMT5 の繋ぎ換えた (Kawamura and Yokoyama, 1998)。培養細胞 COS 1 に pMT5-cDNA を導入し、11-*cis* レチナル取り込み後、再構成視物質を精製し、紫外可視分光光度計 (日立 U-3000) で視物質の吸収光を測定した。詳しい方法は Kawamura と Yokoyama (1998) を参照。

## 3. 結果

### 3-1 コモンマーモセット

#### 3-1-1 Red/Yellow/Green 3 対立遺伝子の構造

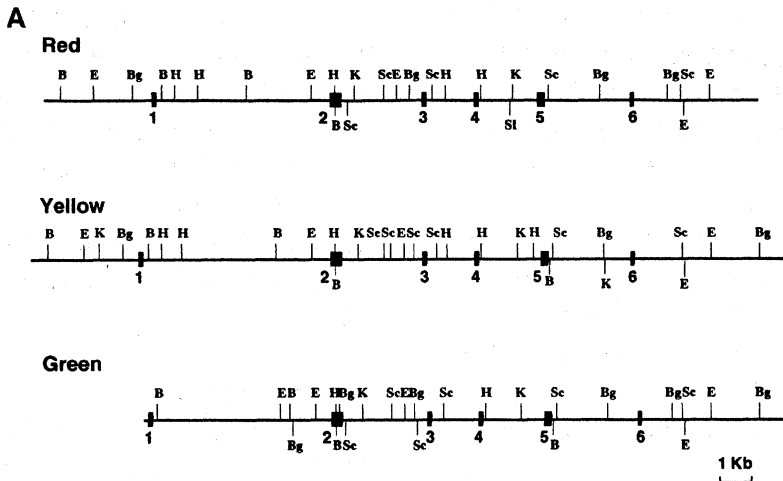


図 1 A コモンマーモセット Red-Green 遺伝子のゲノム構造。A) 黒いボックス部分は 6 つのエクソンを表す。制限酵素の略号は次の通り。B, *Bam* HI; Bg, *Bgl* II; E, *Eco* RI; H, *Hin* dIII; K, *Kpn* I; Sc, *Sac* I; Sl, *Sal* I.

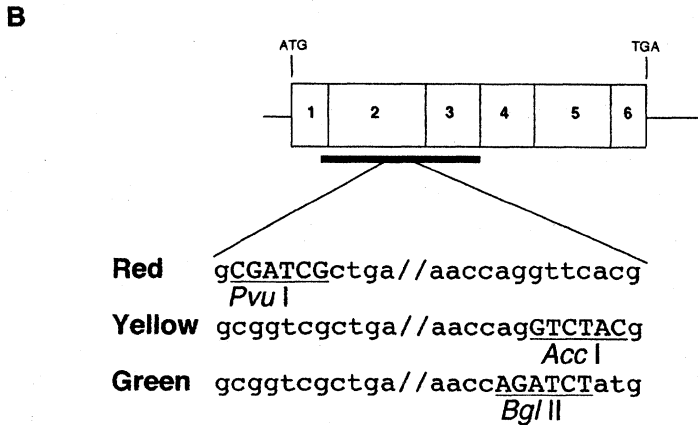


図 1 B コモンマーモセット Red-Green 遺伝子の cDNA 構造。B) 開始 (ATG) と終止 (TGA) コドン間の cDNA 領域をボックスで示した。番号はエクソンを表す。太線部 488 塩基長を RT-PCR 法で増幅し、図 4 B の遺伝子発現のアッセイに用いた。Red, Yellow, Green 遺伝子はこの領域にそれぞれ特有の制限酵素認識部位 (*Pvu* I, *Acc* I, *Bgl* II) を有する。

2 個体分のゲノムライブラリーから合計 3 種類の遺伝子が単離された (図 1 A)。これらの塩基配列は既に公開されているコモンマーモセットの Red/Yellow/Green の配列 (Shyue *et al.*, 1998) と対応していた。Shyue ら (1998) との配列の違いはすべて同義置換であった。

続いて合計 32 個体のコモンマーモセット (オス 19, メス 12, 性別不明 1) について Red-Green

様遺伝子の数を調べるために、各 DNA を制限酵素 *Bgl* II で完全消化し、ヒト Red 遺伝子のエクソン 2 部分をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。この場合、図 1 A から、Red と Yellow 遺伝子はそれぞれ 8.5 kb, 15 kb のバンドとして、Green 遺伝子 2.3 kb と 1.4 kb のダブルバンドとして現れることがわかるので、これをもとに遺伝子型を調べることができる。す

すべてのサンプルはこれらのいずれかのバンドかあるいはそれらの組み合わせを示し、それら以外のバンドは検出されなかった。図2にその代表的パターンを示した。

これまでに PCR 法によってコモンマーモセツ

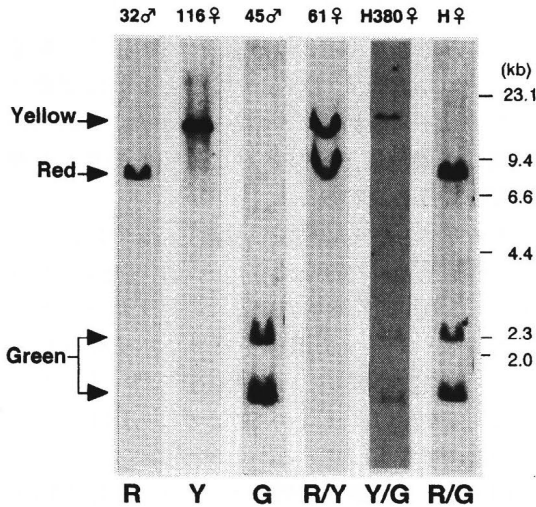


図2 サザンハイブリダイゼーションによるコモンマーモセツの Red-Green 様遺伝子の検出。個体番号 116 と H の DNA は脳から、H 380 は心臓から、他は血液から抽出された。

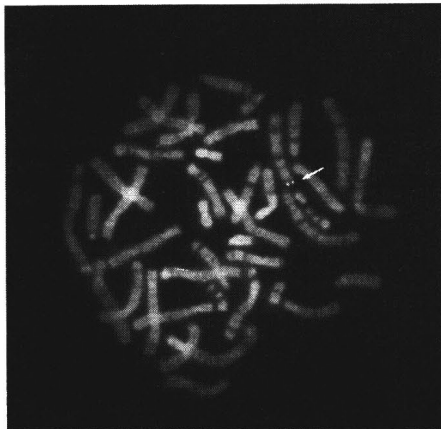


図3 FISH 法によるマーモセツ Red-Green 遺伝子の染色体位置の同定。オスのマーモセツの分裂中期染色体標本の X 染色体長腕先端部に twin spot としてシグナルが観察される (矢印)。

トの3つの対立遺伝子は塩基配列が調べられている (Williams *et al.*, 1992; Hunt *et al.*, 1993; Shyue *et al.*, 1998)。しかし、Red-Green 遺伝子レパトリーの検索を行うにはゲノム DNA に対するサザンハイブリダイゼーションが最も確実であり、それは本研究で初めて明らかにした遺伝子の全体構造の情報があって初めて可能となったのである。

### 3-1-2 Red-Green 遺伝子のX染色体支配の証明

1 個体につき 20 個の分裂中期細胞を観察したところ、すべての細胞で X 染色体長腕末端部分にのみハイブリダイゼーションシグナルが検出された (図3)。以前のコモンマーモセツに関する Red-Green 視物質表現型の家系分析では X 染色体支配は明瞭には支持されなかった (Travis *et al.*, 1988; Tovee *et al.*, 1992)。現在までのところ家系分析が行われたのは他にはリスザルだけであり、そこでは X 染色体 1 座位 3 対立遺伝子仮説と矛盾しない結果が得られている (Jacobs and Neitz, 1987)。したがって今回の我々の結果が新世界ザルで初めて直接的かつ確定的支持を X 染色体支配仮説に与えた。

### 3-1-3 血液キメリズム

上述のように我々はコモンマーモセツの Red-Green 遺伝子が X 染色体にあることを実証し、Red, Yellow, Green 以外にはゲノム中に Red-Green 様遺伝子が存在しないことを示した。したがって図2のようなサザンハイブリダイゼーション実験ではオスには1つ、メスには1つ乃至2つの遺伝子が検出されることが期待される。ところが約半数 (10/19) のオスは2つの遺伝子の存在を示した (図4A)。我々はさらに3つすべての遺伝子を示すメス2個体をも見出した。ほとんどの場合、特に DNA が血液以外の組織から抽出された場合、1つの個体の中でも遺伝子のバンドの濃さに大きな差異が認められた (図4A)。

マーモセツ科では通常胎児は2卵性双生児であり、それらの胎盤が癒合し血管で結ばれ、血液が混合する (血液キメリズム) (Benirschke *et*

al., 1962)。性の異なる双子の白血球染色体を調べた結果、XY型とXX型の細胞が1つの個体に混在していることが確認され(データ未発表)、血液キメリズムが我々の対象としたマーモセットに実際に生じていることが明らかとなった。したがって、オスに2つ、メスに3つの遺伝子が検出されたのはこのキメリズムのためであると考えら

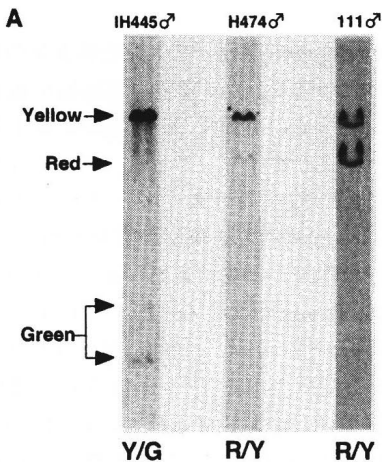


図4 A マーモセット Red-Green 遺伝子のゲノム DNA サザンハイブリダイゼーション。A) 個体番号 IH445 からは Yellow と Green, H474 と 111 からは Red と Yellow 遺伝子が検出されている。IH445, H474, 111 の DNA はそれぞれ脳, 肺, 血液から抽出された。

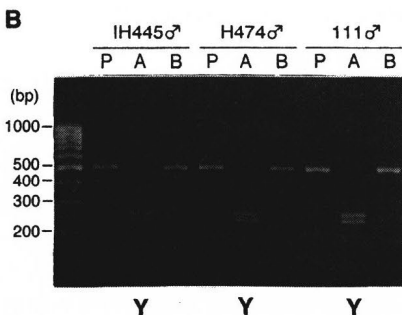


図4 B マーモセット Red-Green 遺伝子の RT-PCR による発現アッセイ。B) 488 塩基長 cDNA (図1 B 参照) を網膜 RNA より増幅した。Pvu I (P), Acc I (A), Bgl II (B) はそれぞれ Red, Yellow, Green の cDNA を 289 + 199, 255 + 233, 253 + 235 塩基長に切断する。

れた。

細胞のキメリズムは非造血系組織では生じていないか、あっても検出できないほどにわずかであることがわかっている (Signer *et al.*, 2000)。サザンハイブリダイゼーションにおいて、血液以外の組織から抽出した DNA で、2つの遺伝子のバンドが同じ程度の濃さを示したのは、メスのサンプルのみであり (図2の H はその例)、また網膜から2つの遺伝子 cDNA を検出あるいは単離できたのもメスのサンプルのみであった。これらの結果は X 染色体 1 座位 3 対立遺伝子モデルを強く支持するものである。

キメリズムがもし網膜の視細胞にまでおよべば、双子の相手の視物質を使った色覚が可能かもしれない。この可能性を検討するため、サザンハイブリダイゼーションで遺伝子を2つ示すオスについて、網膜で発現している遺伝子を調べることにした。図4Aのようにオスであるにも関わらず2つの遺伝子をもっているかのようなパターンを示す個体のうち3個体の眼球サンプルを得、図1Bに示す cDNA 領域を RT-PCR で増幅した。この領域には Red, Yellow, Green それぞれのみを切断する制限酵素サイトがあり (Pvu I, Acc I, Bgl II), これらのどれで切断されるかで発現遺伝子の型を知ることができる (図1B)。図4Aの3個体は全て Yellow のみを発現しており、キメリズムは双子の色覚に影響を与えないことが支持された (図4B)。

### 3-1-4 $\lambda$ max の測定

コモンマーモセットの Red, Yellow, Green 遺伝子の全翻訳領域 cDNA を単離し *in vitro* で視物質再構成を行い吸光度を測定した結果、それぞれ  $561 \pm 1$  nm,  $553 \pm 1$  nm,  $539 \pm 1$  nm の  $\lambda$  max をもつことが明らかになった (図5)。

Yokoyama と Radlwimmer (1999) は脊椎動物 Red-Green 視物質に関して、5つのアミノ酸座位の変化 S180A (180番目のアミノ酸でセリンからアラニンへの置換), H197Y, Y277F, T285A, A308S が  $\lambda$  max をそれぞれ 7, 28, 7, 15, 16 nm だけ blue 方向に移動させ、逆の置換

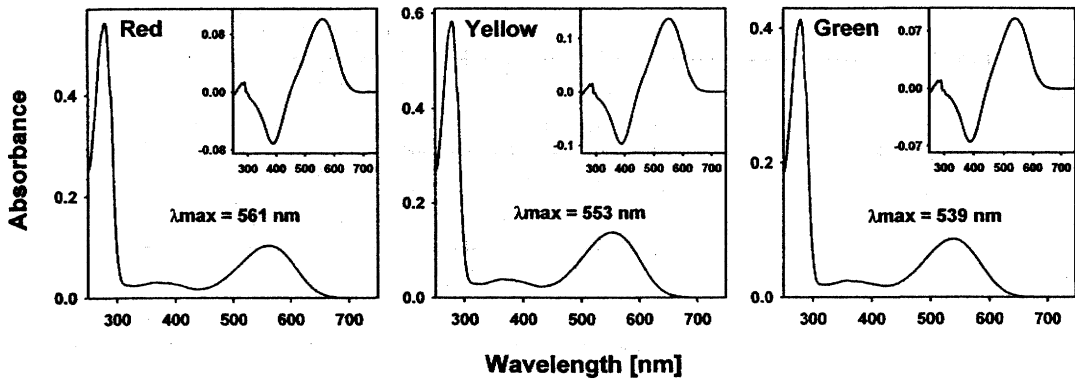


図5 マーモセットの Red, Yellow, Green 再構成視物質の吸収波長の測定。視物質の暗状態での吸光度（暗スペクトル）が表示されている。各ボックス内は視物質に光を照射した場合の照射後の吸光度を照射前の吸光度から差し引いた差異スペクトルである。差異スペクトルの  $\lambda_{max}$  は暗スペクトルのものと同一であった。

はそれぞれ同程度に red 方向に移動させることを示した。さらにこれによりこれら5カ所のアミノ酸から非常に正確に  $\lambda_{max}$  推定できることを示した。コモンマーモセットの3つの視物質の5カ所のアミノ酸組成とそこから推定される  $\lambda_{max}$  を表1に示した。Red, Yellow, Greenとも期待値と実測値が実質的に同一であることが示された。

コモンマーモセットの3つの視物質は全て共通して H 197 (197番目アミノ酸がヒスチジン), Y 277, A 308 であるため、3者の  $\lambda_{max}$  の違いは180と285の2カ所のアミノ酸の違いがもたらしていることになる。Asenjoら(1994)はさらに4つのアミノ酸座位(116, 230, 233, 309)がヒトのRedとGreenの  $\lambda_{max}$  の違いに微小ながら効いていることを示した。コモンマーモセットの3つの視物質もまた116と233ではアミノ酸に変異が見られる。Shyueら(1998)はさらに229も微小な効果をもつことを配列の比較から提起している。これらの効果は変異導入遺伝子作製と *in vitro* 視物質再構成実験により検証されなければならない。しかしながら、我々の正確な  $\lambda_{max}$  測定に基づく結果からは、これらのアミノ酸座位の効果は測定誤差と区別がつかないかあるいはあるとしても無視できる程に小さいと考えられる。

これまでコモンマーモセットの Red, Yellow, Green の  $\lambda_{max}$  は、顕微鏡下で網膜視細胞に直

接ビームを照射し吸光度を測定する microspectrophotometry (MSP) という方法で測定され、Travisら(1988)は567, 559, 545 nm, Toveeら(1992)は563, 556, 543 nm という値を報告している。これらの測定は大きな標準誤差 [Travisら(1988)で最大5.8 nm, Toveeら(1992)で最大4.7 nm] をもち信頼性に問題があった。近縁種であるタマリンの研究では電気生理学的方法, electroretinogram (ERG), を用いて類似した値, 562, 556-557, 541-545 nm, を報告している (Jacobs *et al.*, 1987; Neitz *et al.*, 1991; Jacobs and Deegan, 1994)。それでこれらの値はマーモセット科として562, 556, 543 nm としてまとめられている (Jacobs, 1996)。*in vitro* 視物質再構成法は直接かつ正確に  $\lambda_{max}$  を測定する方法である (Yokoyama and Radlwimmer, 1999)。本研究は新世界ザルの視物質にこの方法を適用した最初の研究であり、霊長類の  $\lambda_{max}$  調整機構は *in vitro* 視物質再構成法で測定した正確な値を用いて再検討されなければならない。

### 3-2 ヨザル

#### 3-2-1 多数の偽 Green 遺伝子座の存在

上述のようにコモンマーモセットでは Red-Green 遺伝子は確かに仮説通り X 染色体1座位であることが明らかとなった。ではこのシステム

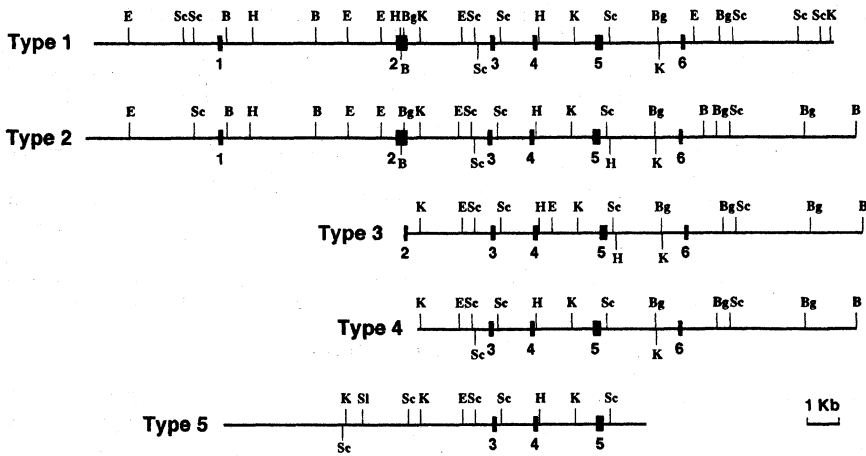


図6 ヨザルの5つのGreen様遺伝子の制限酵素地図。黒いボックスはエクソン部分を表す。制限酵素略号は図1と同じ。

表1 コモンマーモセット Red-Green 視物質の5アミノ酸座位組成とλmax

視物質	λmax (nm)					予測値	実測値
	180	197	277	285	308		
Red	S	H	Y	T	A	560	561
Yellow	A	H	Y	T	A	553	553
Green	A	H	Y	A	A	538	539

は新世界ザルでどのくらい普遍的なのだろうか。現在までにホエザルがその例外であることが報告されている他は1座位仮説を逸脱するものは見出されていない。我々は真猿類中唯一夜行性であるヨザルが意外にも新たな例外であることを発見した。ヨザルはこれまで多型がないという観点で例外的と考えられていたが、遺伝子座の数自体は1つと考えられていたからである。

我々はオスのヨザルのゲノム中に5つのRed-Green様遺伝子を見出した(図6)。Type 1と2ではすべてのエクソンを得ることができたが、他の遺伝子は部分的にしか得ることができなかった。

5者に共通に得られたのはエクソン3から5であり、またこの領域に上述した5つの重要なアミノ酸座位が全て含まれるため、まずはこれら3つのエクソンの塩基配列を決定した。その結果5者ともマーモセットGreen(表1)と同様にA180, H197, Y277, A285, A308であることがわかり、この配列からλmaxは538nmと推定された(Yokoyama and Radlwimmer, 1999)。よってヨザルの遺伝子をGreenと呼称することにした。

塩基配列を決定したことにより、さらに興味深いことが明らかになった。5者のうち1つ



```

TYPE 1  GG ATC ACG GGT CTC TGG TCC CTG GCC ATC ATT TCC TGG GAG AGG TGG CTG GTT GTC TGC
TYPE 2  .. ... .. ... .. ... .. ... .. G.. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 3  .. ... .. ... .. ... .. ... .. .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 4  .. ... .. ... .. ... .. ... .. G.. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 5  .. ... .. ... .. ... .. ... .. G.. ... .. ... .. ... .. ... ..

TYPE 1  AAG CCC TTT GGC AAC GTG AGA TTT GAT GCC AAG CTG GCC ATC GTG GGC ATT GCC TTC TCC
TYPE 2  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 3  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 4  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 5  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..

                                180
TYPE 1  TGG ATC TGG GCT GCT GTG TGG ACA GCC CCG CCC ATC TTT GGT TGG AGC AGG TAC TGG CCC
TYPE 2  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 3  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ..A .. ... .. ..A .. ... ..
TYPE 4  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 5  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..

                                197
TYPE 1  CAT GGC CTG AAG ACT TCC TGC GGC CCA GAC GTG TTC AGT GGC AGC TCG TAC CCC GGG GTG
TYPE 2  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 3  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 4  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 5  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..

TYPE 1  CAG TCT TAC ATG ATG GTC CTC ATG ATC ACA TGC TGC ATC CTC CCA CTC AGC ATC ATT GTG
TYPE 2  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 3  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ..T. ... ..
TYPE 4  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 5  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..

                                *247
TYPE 1  CTC TGC TAC CTC CAA GTG TGG CTG GCC ATC CGA GCG GTG GCA AAG CAG CAG AAA GAG TCC
TYPE 2  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. T.. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 3  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 4  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. T.. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 5  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. T.. ... .. ... .. ... .. ... ..

TYPE 1  GAA TCC ACC CAG AAG GCA GAG AAG GAA GTG ACG CGC ATG GTG GTG GTG ATG ATC GTG GCG
TYPE 2  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 3  A.. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. A.. ...
TYPE 4  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 5  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..

                                277                                *284 285
TYPE 1  TAC TGC GTC TGC TGG GGA CCC TAC GCC TTT TTC GCG TGC TTT GCT GCT GCC AAC CCT GCC
TYPE 2  ... .. ... .. ... .. GGA CCC ..G .. ... .. ... .. ... .. ..A .. ...
TYPE 3  ... .. ... .. ... .. ... .. ..G .. ... .. ... .. ... .. ..A .. ...
TYPE 4  ... .. ... .. ... .. ... .. ..G .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 5  ... .. ... .. ... .. ... .. ..G .. ... .. ... .. ... .. ... ..

                                308
TYPE 1  TAC GCC TTC CAC CCT CTG ATG GCT GCC CTG CCA GCC TAC TTT GCC AAA AGT GCC ACT ATC
TYPE 2  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 3  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 4  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ..G. ... ..
TYPE 5  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..

TYPE 1  TAC AAC CCC ATT ATC TAT GTC TTT ATG AAC CGG CAG
TYPE 2  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 3  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 4  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
TYPE 5  ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
    
```

図7 ヨザルの5つのGreen様遺伝子のエクソン3-5領域の塩基配列。3つのエクソンの塩基配列は連結して表示してある。ドットはType 1 遺伝子と同一塩基であることを表す。アミノ酸の180, 197, 277, 285, 308にあたるコドンにそれらの番号を表示してある。終止コдонになっている部位はそのコドン番号に\*をつけて表示している。

(Type 1) を除いてすべて途中で終止コドンをもっていることが判明したのである(図7)。終止コドンのためこれらの遺伝子はたとえ転写翻訳されても最後の2つの膜貫通領域とレチナール結合部位を欠いているため、正常な機能は果たし得ない。即ちこれらの遺伝子は偽遺伝子化していることが明らかになった。

### 3-2-2 Green 視物質の $\lambda_{max}$

機能遺伝子と考えられる Type 1 遺伝子の全エ

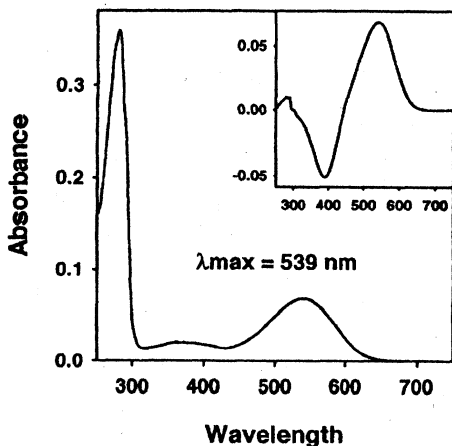


図8 ヨザル Green 再構成視物質の暗スペクトルと差異スペクトル(ボックス内)。差異スペクトルの  $\lambda_{max}$  は  $540 \pm 1$  nm。

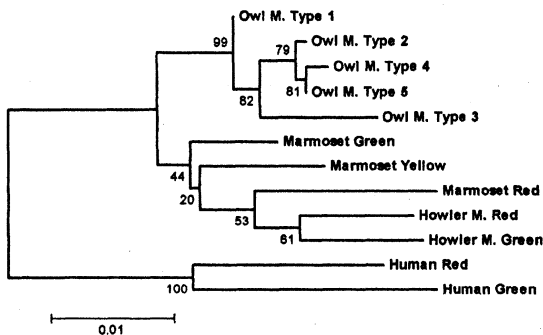


図9 ヨザル, マーモセット, ホエザル, ヒトの Red-Green 遺伝子の系統樹。エクソン 3-5 の塩基配列を用い, 進化距離  $d$  は  $d = -(3/4) \ln [1 - (4/3)p]$  により求めた ( $p$  は塩基相違度)。系統樹は近隣結合法により構築し, クラスタリングの信頼性はブートストラップ確率 (1000 回試行) により検証した。系統樹の各分岐点にブートストラップ確率が表示してある。

クソンの塩基配列を決定し, ヨザルの網膜から単離した cDNA の配列と比較した結果, 両者は完全に同一であることが明らかになった。この cDNA を用いて *in vitro* 視物質再構成法でヨザル Green の  $\lambda_{max}$  を測定し, それが  $539 \pm 1$  nm であることを明らかにした(図8)。これは, マーモセットの場合と同様に, 予測値と実質的に同一であった。

### 3-2-3 系統解析

ヨザルにみられる Green 遺伝子の遺伝子重複はホエザルにおける Red と Green への遺伝子重複と独立に生じたのであろうか, それとも共通の祖先で生じたのであろうか。そのことを明らかにするため, エクソン 3, 4, そして 5 の領域についてヨザルの 5 つの Green 様遺伝子の塩基配列をホエザルの Red と Green, コモンマーモセットの Red, Yellow, Green, そして外群としてヒトの Red と Green と比較し, 系統樹を作製した(図9)。系統樹はヨザルの 5 つの Green 様遺伝子が単系統であることを高いブートストラップ確率 (99%) で支持していた。さらに現在入手可能な全ての新世界ザルの配列データ [タマリン, リスザル, オマキザル, サキ: Boissinot ら (1998)] を加えてもヨザルの単系統は依然高いブートストラップ確率 (98%) で支持された (データ未発表)。このことはヨザルにおいてホエザルとは独立に遺伝子重複が生じたことを示していた。

図9の系統樹はまたヨザルの機能遺伝子 Type 1 Green の進化速度が他の4つの Green 偽遺伝子より遅いことを示唆している。このことは非機能遺伝子が機能遺伝子より速く塩基置換を蓄積するという, 中立進化の典型的パターンと一致している。

### 3-3 オマキザル

ヒト Red 遺伝子のエクソン 2 をプローブとしてオマキザル 6 個体 (オス 4, メス 2) のゲノム DNA に対してサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果, オスの 1 個体 (MC 1) においては用いた 4 種類すべての制限酵素について 2

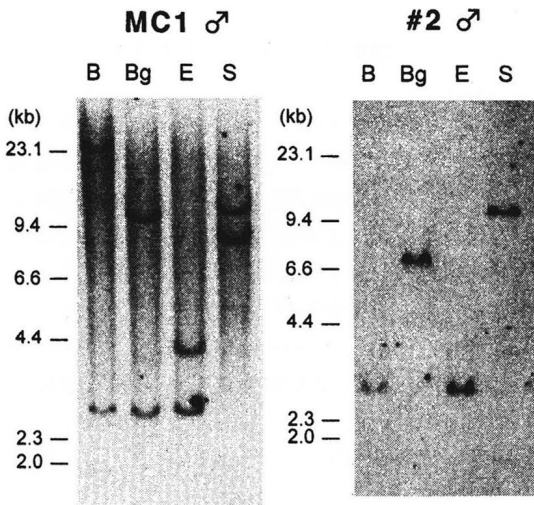


図10 オマキザルの Red-Green 様遺伝子に対するザンハイブリダイゼーション。B, *Bam* HI; Bg, *Bgl* II; E, *Eco* RI; S, *Sac* I.

本のバンドが検出され (図 10), 2つの遺伝子座の存在が強く示唆された。ところが他の個体では基本的に1本のバンドが検出されるのみで、遺伝子座は1座位であることが示唆された (図 10の #2)。このことはオマキザルに種内変異として Red-Green 遺伝子の1座位型と2座位型が存在することを示唆している。

#### 4. 考察

新世界ザルの色覚は大きな種内変異を示す点で特異である。これは Red-Green 視物質遺伝子に関する「X染色体1座位3対立遺伝子仮説」で説明されてきた。しかしながらこの仮説は直接的な DNA レベルの検証をこれまで免れてきた。また、新世界ザルの視物質の正確な最大吸収波長、即ち  $\lambda_{max}$  もこれまで測定されずにきた。本研究ではまずコモンマーモセットを研究対象として「X染色体1座位3対立遺伝子仮説」を細胞遺伝学的及び分子生物学的方法により実証した。そしてコモンマーモセットとヨザルに関し、新世界ザルで初めて Red-Green 視物質の正確な  $\lambda_{max}$  を確定した。さらにそれに基づき、2つのアミノ酸座位 180 と 285 のみでマーモセットの Red, Yellow,

Green の  $\lambda_{max}$  の違いが生じていることを示した。最後に、ヨザルとオマキザルの Red-Green 様遺伝子の観察から Red-Green 視物質遺伝子の座位数は、単にホエザルを例外とするのではなく、これまで考えられていた以上に多様であることを示した。

ヨザルは伝統的にはティティに系統的に近いと考えられてきたが、最近の分子レベルの研究ではマーモセット科に近いとする結果が得られている (Schneider *et al.*, 1993)。いずれにしてもヨザルが新世界ザルの共通祖先から単独に分岐していることを支持するデータはこれまでにない。このことはヨザルが夜行性であるにも関わらずタペータムを有せず、よって昼行性の祖先から夜行性に二次的に進化したとする伝統的な考えとも一致する (Fleagle, 1999)。一方、新世界ザルの Red-Green 遺伝子の3対立遺伝子システムはその起源を新世界ザルの共通祖先 (Boissinot *et al.*, 1998)、さらには原猿類を含む霊長類の祖先にまで辿ることができると考えられている (Tan and Li, 1999)。したがって、ヨザルはその祖先においては Red, Yellow, Green の3対立遺伝子を有する2色・3色型混合であったはずであり、おそらく夜行性へと進化していく過程で Red と Yellow の対立遺伝子を喪失したと考えられる。ところがヨザルは一方では残った Green 遺伝子を重複させたのであり、その時点では色覚を向上させる機会を得たことになる。しかし、結局は重複遺伝子の一方を偽遺伝子化してしまい、向上の機会を捨ててしまったことになる。

興味深いことにヨザルは Blue の遺伝子も終止コドンによって偽遺伝子化しており、少なくとも錐体細胞による視覚に関しては Green のみしかもたない単色型、即ち完全色盲であると考えられている (Jacobs *et al.*, 1996b)。夜行性の原猿であるオオギャラゴ (*Otolemur crassicaudatus*) でも類似の現象、即ち Blue 遺伝子の不活化が起きている (Jacobs *et al.*, 1996b)。夜行性の動物にとってこれらの突然変異は淘汰上中立であり得、よってすべて偶然的に固定されたものとみることができる。しかし一方で、夜行性の強い動物には

色覚が単に不要だけでなく、何らかのデメリットを与え、錐体視物質の種類を1つに保たせるような自然淘汰が働いている可能性も否定できないと考える。今後多くの夜行性動物の視物質遺伝子を調べることでより強い示唆が得られると考える。

オマキザルに3対立遺伝子型と2座位型が混在することは、非常に興味深い示唆を与える。オマキザルのオスにみられた2つの遺伝子が異なる $\lambda$  maxをもつものであれば、色覚においても(オスが必ず2色型になる)多型型と(オスも必ず3色型になる)普遍型が混在することになるからである。これまで3対立遺伝子システムが数千万年も維持されてきたのは、3色型が2色型より単純に有利なためであり、一種の超優性淘汰により変異が維持されてきたためと考えられている。狭鼻猿のような普遍型でないのは、単に2座位型という突然変異体が出現しなかっただけであるとしてこれまで考えられてきた。また、ホエザルではたまたまそれが起こり、多型型から普遍型へ移行したと考えられている。もしオマキザルに多型型と普遍型が非常に古くから混在していれば、多型型の適応的意味に別な解釈(例えば、2色型が3色型より有利な状況がある、あるいは、色覚に変異があること自体に社会行動上の意味がある、など)が必要とされることになるかもしれない。

色覚の適応的意味を理解するには、その動物が色覚を実際にどのように使っているかを明らかにしなければならない。そのためには色覚の違う個体間でその行動の違いを観察していく必要があると考えられる。実験的に遺伝子操作等により色覚変異体を作出して野生型と比較するという方法が、昨今の分子生物学的な発想であろう。例えばゼブラフィッシュなどを用いればこれは実現可能と思われる。一方で自然界にすでに存在する変異を利用する方法がある。新世界ザルは自然状態で大きな色覚変異をもつ特異な動物群である。彼らの様々な行動や社会関係に色覚の違いは全く影響していないのだろうか? 動物行動学, 心理学, 分子生物学などの垣根を越えた学際的アプローチにより、そう遠くない将来にその答えが見えてくるのではないだろうか。

## 謝辞

財団法人実験動物中央研究所動物実験センターの谷岡功邦先生ならびに石井一先生には貴重なマモセットの組織を分与いただき心より感謝申し上げます。また、京都大学霊長類研究所の竹中修教授には霊長類試料の収集において多大な御協力をいただきましたことを感謝致します。東京大学の平井百樹教授にはFISH実験において御助力いただきましたことをお礼申し上げます。シラキュース大学のShozo Yokoyama教授とBernhard Radlwimmer氏には視物質再構成実験で御協力いただきありがとうございます。本研究は文部省科学研究費(09554056と09740647)と京都大学霊長類研究所共同利用研究により行われた。

## 引用文献

- Asenjo A B, Rim J, Oprian D D 1994: Molecular determinants of human red/green color discrimination. *Neuron* 12: 1131-1138.
- Benirschke K, Anderson J M, Brownhill L E 1962: Marrow chimerism in marmosets. *Science* 138: 513-515.
- Boissinot S, Tan Y, Shyue S-K, Schneider H, Sampaio I, Neiswanger K, Hewett-Emmett D, Li W-H 1998: Origins and antiquity of X-linked triallelic color vision systems in New World monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13749-13754.
- Fleagle J G 1999: *Primate Adaptation and Evolution*, 2nd Ed. Academic Press, San Diego.
- Hirai M, Suto Y, Kanoh M 1994: A method for simultaneous detection of fluorescent G-bands and in situ hybridization signals. *Cytogenet. Cell Genet.* 66: 149-151.
- Hunt D M, Williams A J, Bowmaker J K, Mollon J D 1993: Structure and evolution of the polymorphic photopigment gene of the marmoset. *Vision Res.* 33: 147-154.
- Jacobs G H 1996: Primate photopigments and primate color vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 577-581.
- Jacobs G H 1998: A perspective on color vision in platyrrhine monkeys. *Vision Res.* 38: 3307-3313.
- Jacobs G H, Deegan II J F 1994: Photopigment polymorphism in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). *Am. J. Primatol.* 33: 217 (abstr.).
- Jacobs G H, Neitz J 1987: Inheritance of color vision in a New World monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA 84: 2545-2549.
- Jacobs G H, Neitz J, Crognale M 1987: Color vision polymorphism and its photopigment basis in a callitrichid monkey (*Saguinus fuscicollis*). *Vision Res.* 27: 2089-2100.
- Jacobs G H, Deegan II J F, Neitz J, Crognale M A, Neitz M 1993: Photopigments and color vision in the nocturnal monkey, *Aotus*. *Vision Res.* 33: 1773-1783.
- Jacobs G H, Neitz M, Deegan J F, Neitz J 1996a: Trichromatic color vision in New World monkeys. *Nature* 382: 156-158.
- Jacobs G H, Neitz M, Neitz J 1996b: Mutations in S-cone pigment genes and the absence of colour vision in two species of nocturnal primate. *Proc. R. Soc. Lond. B* 263: 705-710.
- Kawamura S, Yokoyama S 1998: Functional characterization of visual and nonvisual pigments of American chameleon (*Anolis carolinensis*). *Vision Res.* 38: 37-44.
- Nathans J, Thomas D, Hogness D S 1986: Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. *Science* 232: 193-202.
- Neitz M, Neitz J, Jacobs G H 1991: Spectral tuning of pigments underlying red-green color vision. *Science* 252: 971-974.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 1989: *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schneider H, Schneider M P C, Sampaio I, Harada M L, Stanhope M, Czelusniak J, Goodman M 1993: Molecular phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, Primates). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2: 225-242.
- Shyue S-K, Boissinot S, Schneider H, Sampaio I, Schneider M P, Abee C R, Williams L, Hewett-Emmett D, Sperling H G, Cowing J A, Dulai K S, Hunt D M, Li W-H 1998: Molecular genetics of spectral tuning in New World monkey color vision. *J. Mol. Evol.* 46: 697-702.
- Signer E N, Anzenberger G, Jeffreys A J 2000: Chimaeric and constitutive DNA fingerprints in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Primates* 41: 49-61.
- Tan Y, Li W-H 1999: Trichromatic vision in prosimians. *Nature* 402: 36.
- Tovee M J, Bowmaker J K, Mollon J D 1992: The relationship between cone pigments and behavioral sensitivity in a New World monkey (*Callithrix jacchus jacchus*). *Vision Res.* 32: 867-878.
- Travis D S, Bowmaker J K, Mollon J D 1988: Polymorphism of visual pigments in a Callitrichid monkey. *Vision Res.* 28: 481-490.
- Williams A, Hunt D M, Bowmaker J K, Mollon J D 1992: The polymorphic photopigments of the marmoset: spectral tuning and genetic basis. *EMBO J.* 11: 2039-2045.
- Yokoyama S, Radlwimmer F B 1999: The molecular genetics of red and green color vision in mammals. *Genetics* 153: 919-932.

(Summary)

## Evolution of Red-green Visual Pigment Genes and Color Vision of New World Monkeys

Shoji KAWAMURA

*Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo*

Most New World (NW) monkeys exhibit extensive intra-specific variations in color vision, where males are dichromatic (red-green colorblind) and females are either dichromatic or trichromatic. This is explained by a model that the red-green visual pigment genes of NW monkeys exist as a single-locus gene with three allelic variations residing on X-chromosome (“tri-allelic single-locus X-chromosome model”). In this study we investigated genomic organization of red-green visual pigment genes of common marmoset (*Callithrix jacchus*) and owl monkey (*Aotus trivirgatus*). By fluorescence in situ hybridization (FISH), we directly localized the pigment gene at a locus on X-chromosome of common marmoset. The study on the marmoset provided direct and conclusive evidences for the “tri-allelic single-locus X-chromosome model” on the genetic basis of marmoset color vision.

By using *in vitro* pigment regeneration method, we determined exact peak absorption spectrum

( $\lambda$  max) of all three allelic pigments, red, yellow, and green, of the marmoset, to be 561, 553, and 539 nm, respectively, and green pigment of owl monkey to be 539 nm, which were precise to within  $\pm 1$  nm. These values were virtually identical to predicted values based on amino acid sequence at five critical sites: 180, 197, 277, 285, 308.

Interestingly, the nocturnal owl monkey was found to possess multiple green pseudogenes. The phylogenetic analysis indicated that duplications of the green genes occurred in owl monkey lineage and were independent from that in the howler monkey, the only known NW monkey having red and green genes on separate loci. By Southern hybridization, we found one male capuchin monkey (*Cebus apella*) that appeared to have two red-green-like visual pigment genes. The results obtained from studies on owl monkey and capuchin suggest that the evolution of color vision in NW monkey is more complicated than ever considered.

---

河村正二 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

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Shoji KAWAMURA Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences,  
The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

e-mail: kawamura@k.u-tokyo.ac.jp