

重複遺伝子機能分業の観点から見た魚類多重視覚光受容体ファミリーの進化

●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

<研究の目的と進め方>

脊椎動物には5タイプの視物質オプシン[RH1(桿体型)、SWS1(紫外線型)、SWS2(青型)、M/LWS(赤-緑型)、RH2(緑型)]が存在するが、魚類は遺伝子重複によりそれらのタイプ内にサブタイプのレパートリーをもち、豊かで多様なオプシンレパートリーを誇っている。これは水環境という多様な光環境への適応であると考えられる。生態学的意義に直結した魚類のオプシンサブタイプ分化は、遺伝子重複後の機能分業(subfunctionalization)とそのメカニズムの進化を研究する優れたモデルである。本研究者は本計画以前にゼブラフィッシュを用いて魚類で初めてゲノム中の全オプシン遺伝子レパートリーを単離し、ゼブラフィッシュが吸収波長の分化した2つのM/LWSタイプと4つのRH2タイプのオプシン遺伝子を持つことを示していた。それらのサブタイプ遺伝子同士はゲノム中で隣接しており、網膜中の発現領域を異にしている。興味深いことに、M/LWSタイプにおいてもRH2タイプにおいてもより長波長感受型のサブタイプが網膜の腹側、即ち上方を見る領域で発現し、より短波長感受型のサブタイプが網膜の中央から背中側、即ち正面から下方を見る領域で発現している。本研究では視物質オプシン遺伝子レパートリーの発現分化と吸収波長分化の様相を様々な系統と生態の魚種で調べ、モデル生物であるゼブラフィッシュとメダカへの遺伝子導入実験系を活用して、それらの発現制御機能の保存性と多様性を明らかにすることを目的とした。特にRH2タイプオプシンのサブタイプ遺伝子を統括的に発現制御するLocus Control Region(LCR)の働きを詳細に解明することとした。本研究は視物質オプシンについて、ゲノム構成の調査、視物質再構成、発現解析を通じて、視覚とオプシンという視点から深く掘り下げた、機能と直結した比較ゲノム研究を行なうことで、特に重複遺伝子機能分業の多様性に関し、ゲノム進化の研究に貢献できると考えた。

<研究開始時の研究計画>

1. **ゼブラフィッシュを用いたRH2タイプオプシンLCR領域の機能解析**：本研究者は本計画開始前にゼブラフィッシュRH2タイプオプシンの4つのサブタイプ遺伝子を含むPACクローンを取得していた。そこでそれを鋳型にして各遺伝子を相同組換えによりGFPやDsRedレポーター遺伝子に置換した改変PACクローンや、それらのLCRを本来の遺伝子列上流の位置から各遺伝子の直下に移設した改変PACクローン等を作成することにした。これらをゼブラフィッシュ胚に導入し、次世代のゲノムに導入遺伝子を伝えるトランスジェニックラインにおいて蛍光マーカーの網膜での発現様式を、胚期から成魚まで時間を追って観察することにした。これらによりゼブラフィッシュの4つのRH2タイプオプシン遺伝子の発現分化におけるLCRと各遺伝子の距離及び相対位置の効果及び各遺伝子の直上域、即ちプロモーター領域の貢献を検証することにした。

2. **メダカ-ゼブラフィッシュ種間相互遺伝子導入によるRH2タイプオプシンLCR領域の機能解析**：本研究者は本計画開始前

にメダカのRH2タイプオプシンの3つのサブタイプ遺伝子を含むBACクローンを取得していた。また、塩基配列の比較からメダカのRH2タイプオプシンの遺伝子列上流にゼブラフィッシュで発見されたLCRと相同性の高い領域が存在することが確認済みであった。上述1同様にBACクローンに対する遺伝子の蛍光レポーター置換、LCRの欠失、LCRの移設、LCR-プロモーター-蛍光レポーター連結コンストラクトの作成を行い、メダカ胚に導入してメダカにおけるLCRのRH2タイプオプシン発現特異性への貢献を調べることにした。また、これらのDNAコンストラクトをゼブラフィッシュ胚に、上述1で作成したゼブラフィッシュのDNAコンストラクトをメダカ胚に導入し、網膜における発現パターンを種間比較することにした。

3. **ゼブラフィッシュM/LWSタイプとメダカSWS2タイプのサブタイプオプシン発現特異性を規定する制御領域の同定**：本研究者はゼブラフィッシュの2つのM/LWSタイプを含むPACクローンとメダカの2つのSWS2オプシンを含むBACクローンをすでに取得していた。そこでそれぞれオプシン遺伝子をGFP等のレポーターで置換したコンストラクトを作成し、ゼブラフィッシュあるいはメダカの受精卵に導入して蛍光レポーターがそれぞれのオプシン遺伝子の網膜発現パターンを再現することを確認することにした。その上で必要に応じPACあるいはBACクローン制限断片と遺伝子直上域-レポーターコンストラクトの共導入により制御領域の探索を行なうこととした。ゼブラフィッシュのSWS2タイプオプシンは単一コピーであるがその制御領域は本研究室で同定している。しかし、その領域と明確な相同性を示す領域はメダカSWS2タイプオプシン遺伝子周辺にも他のゲノム領域にもみつからない。そこでゼブラフィッシュSWS2タイプオプシンの制御領域の蛍光レポーターをメダカに導入し、その機能上の相同性を検証し、BACクローン中から見出す領域との配列相同性を再検証することにした。

4. **他の魚類における視物質オプシン遺伝子の単離と吸収波長及び発現の解析**：ゼブラフィッシュやメダカと異なり体色の色情報豊かな魚種として、ゼブラフィッシュの属する骨鰈類からカードナルテトラを、メダカの属する棘鱗類からはグッピーとトゲウオを研究対象に加えることにした。それらの視物質オプシン遺伝子レパートリーをゲノムDNAからの遺伝子クローニングにより解明し、それらの再構成視物質の吸収波長を測定し、各オプシン遺伝子の網膜での発現パターンを*in situ* hybridizationで調べ、ゼブラフィッシュやメダカの発現領域分化パターンと比較することにした。

<研究期間の成果>

1. **ゼブラフィッシュを用いたRH2タイプオプシンLCR領域の機能解析**：LCR-遺伝子直上領域-GFP遺伝子のコンストラクトの作成、及びそれを保持するトランスジェニックラインの樹立を4つすべてのRH2サブタイプ遺伝子について行った。そして、それらトランスジェニック個体の成魚網膜におけるGFP発現を

観察した。すると、3つのサブタイプについては実際の発現パターンを再現した。しかし、残り1つのサブタイプについては、本来は網膜の腹側一部の領域でしか発現しない遺伝子であるのかかわらず、GFPが網膜全域で発現した。この遺伝子の発現が実際には腹側一部の領域に限局されるのは、LCRとの距離が遠いためであると考えた。このサブタイプ遺伝子の本来の発現パターンは、GFP置換PACクローンによっては再現される。そこでPACクローンにおいて、LCRをこの遺伝子の直下に移設し、このサブタイプの発現が変化するかを調べた。すると、発現は網膜の広範囲に広がった。以上の結果は、各サブタイプ遺伝子の発現が、遺伝子直上領域に存在する特異的配列と、LCRとの位置関係によって決定されていることを示す。

2. メダカゼブラフィッシュ種間相互遺伝子導入によるRH2タイプオプシンLCR領域の機能解析：メダカRH2-LCR相同領域をGFP遺伝子と共にゼブラフィッシュ胚に導入したところ、視細胞特異的な発現を誘導した。この結果は、LCRが、配列だけでなく機能的にもメダカゼブラフィッシュ間で保存されていることを示す。つぎに、メダカにおけるLCRの機能を上述BACクローンを用いて解析することにした。最初に、BACクローン中の3つの各サブタイプ遺伝子をGFP遺伝子に置換した。それらコンストラクトをメダカ胚に導入したところ、視細胞でGFPが発現した。次に、LCR相同領域をGFP置換BACクローンから欠失させた。すると、1つのサブタイプ遺伝子については発現が消失したが、他の2つについては発現レベルが変わらなかった。これは、LCRがすべてのサブタイプ遺伝子の発現に必要なわけではないことを示唆し、メダカとゼブラフィッシュでLCRの機能の仕方に大きな違いがあることを意味する。最後にゼブラフィッシュのPACクローンをメダカに導入した。するとゼブラフィッシュの緑タイプ遺伝子の発現がメダカ網膜で誘導された。これはLCRの保存性によると考えられる。さらに、各サブタイプ遺伝子の発現パターンを調べると、ゼブラフィッシュ網膜におけるのと同様のパターンが一部見られた。これは発現パターン分化の大部分がシス配列の進化によって説明できることを意味する。

3. ゼブラフィッシュM/LWSタイプとメダカSWS2タイプのサブタイプオプシン発現特異性を規定する制御領域の同定：ゼブラフィッシュSWS2遺伝子の制御領域を同定し論文発表した。対応する領域は、メダカ、フグ、トゲウオなどの棘鱗上目には保存されていないが、棘鱗上目内では保存的配列がみられ、ゼブラフィッシュとは異なる配列が類似の働きをしている可能性がある。M/LWSオプシン遺伝子上流には棘鱗上目とゼブラフィッシュ間で保存的な領域を2領域見出した。メダカのSWS2タイプ、M/LWSタイプのプローブを用いてin situ hybridizationを行ない、それらの網膜での発現を確認した。メダカのSWS2は2種類のサブタイプとも、網膜での発現が極めて低く、領域も周辺の一部に限局されていた。メダカには日本国内に少なくとも数百万年前に分岐した2系統があり、東～東南アジアにも近縁種が多数知られている。これらの中でSWS2遺伝子の保持を調べてみると、一方を欠失している種や両方を欠失している種が見つかった。SWS2タイプ及びM/LWSタイプオプシン遺伝子それぞれ2種類ずつを含むBACクローンを取得し、各遺伝子とレポーターの置換コンストラクト作成に着手した。

4. 他の魚類における視物質オプシン遺伝子の単離と吸収波長及び発現の解析：カーディナルテトラのM/LWSオプシン遺伝子にはLWS遺伝子1種類とMWS遺伝子2種類があることをゲノム及びcDNAクローンとして単離することで明らかにした。一方RH2オプシン遺伝子は一部のエクソンを欠いており、偽遺伝子化

していることを明らかにした。3種類のM/LWSオプシン遺伝子を再構成し、吸収波長を測定した結果、LWSとMWS間だけでなく、2種類のMLSオプシン間でも吸収波長が分化していることを明らかにした。したがって、壊れたRH2遺伝子の機能を遺伝子重複したM/LWSが補償している可能性がある。2つのMWSサブタイプ間の吸収波長分化は既知の吸収波長調節に関与するアミノ酸サイトでは説明がつかないため、独自のアミノ酸置換により生じていると考えられた。

グッピーからは脊椎動物の持つ5タイプ全てのオプシン遺伝子を単離した。M/LWSタイプには4つもの遺伝子座とその中の2座位に大きなRFLP多型及びアミノ酸多型があることを見出した。グッピーには赤型錐体視細胞の吸収波長の多型が90年代初頭に報告されていたが、それをもたらず遺伝子上の実態は解明されていなかった。したがって、この遺伝子多型がそれを説明すると考えられた。そこで自然選択により多型が維持されていることを検証するために、原産地であるトリニダード島の集団サンプルを入手し、塩基配列レベルの多型性をM/LWS遺伝子と他の遺伝子の間で比較することとした。そのためにゲノム支援班の協力を得て、これらの塩基配列決定を進めている。

トゲウオに関しては日本海型イトヨのラムダフェージベースのゲノムライブラリーを作成し、そこから5タイプ全てのオプシン遺伝子を単離した。系統樹解析から棘鱗上目のメダカ、シクリッド、トゲウオでそれぞれ独立にRH2遺伝子の重複が生じた可能性が示唆された。また、集団間比較に向けて太平洋型イトヨとハリヨのサンプルを入手し、それぞれの全オプシン遺伝子をPCR法で単離した。そしてそれらの再構成を行ない、吸収波長が3系統間で変わらないことを明らかにした。さらに、トゲウオの2種類のRH2オプシンは、3系統とも吸収波長が分化していないことが明らかになった。そして、一方のRH2オプシンは網膜での発現が極めて低いことが明らかになった。これらのことはトゲウオが、その婚姻色の顕著さから予想されたのとは逆に、脊椎動物共通祖先で確立されたオプシンレパートリーを極めて保守的に維持していることを示し、体色や環境光の変動が必ずしも色覚の多様化に結びつくとは限らないことを示している。

<国内外での成果の位置づけ>

ゼブラフィッシュの重複RH2オプシンについて発現制御機構の進化過程の一端を明らかにすることができた。この成果は重複遺伝子の発現分化研究に貢献し、中でも魚類の視物質オプシンにおいては初めての報告となり色覚進化研究に重要な貢献となる。また、メダカとゼブラフィッシュはともにゲノム研究が進んだ優れた実験モデル生物であり、その利点を生かした遺伝子制御領域の進化研究は優れたモデルケースになりえる。さらにメダカは東～東南アジアに広く分布し、オプシン遺伝子の網膜での発現パターンを近縁種間で比較できる利点をもつ。このような観点からのオプシン遺伝子発現パターンの比較解析はこれまでにない。カーディナルテトラにおいてRH2オプシン遺伝子の喪失をM/LWSオプシン遺伝子の重複と分化が補っていたことは脊椎動物のオプシン遺伝子研究において重要な発見といえる。グッピーの集団内色覚多型を遺伝子レベルで解析可能にしたことは、色覚研究のみならず集団の遺伝的多様性研究の優れたモデルとなる。トゲウオの成果は回遊魚で初めて視物質オプシン全レパートリーを単離したことでもあり、生息環境の変化とオプシン遺伝子使用の関連の理解に大きく貢献できる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

一部のM/LWSタイプオプシン遺伝子は様々な実験条件を検討

しても視物質再構成ができず、波長測定が結局測定できなかった。細胞内輸送の過程でのタンパク質の修飾やフォールディングなどに種で特殊化したシャペロンが必要などの状況が生じている可能性が考えられる。

<今後の課題、展望>

ゼブラフィッシュの RH2-LCR と各々の遺伝子上流配列とがどのように相互作用して発現パターンが形成されているのかをより詳細に解析していく必要がある。メダカにおいても RH2 発現パターン分化の制御機構を詳細に明らかにし、SWS2 については BAC クローンに GFP あるいは DsRed レポーターを置換したコンストラクトを用いたトランスジェニックメダカを今後も樹立していく必要がある。カーディナルテトラ網膜における M/LWS オプシン遺伝子の発現パターンを決定し、既にサブタイプ間で網膜における発現パターンが異なっていることが分かっているゼブラフィッシュやメダカと比較していく必要がある。また、カーディナルテトラで独自に波長分化した MWS オプシン遺伝子のどのアミノ酸置換が吸収波長の変化をもたらしたのか、site-directed mutagenesis と視物質再構成の方法を用いて特定する必要がある。グッピーとトゲウオの全てのタイプのオプシン遺伝子において、網膜上での発現パターンを *in situ* hybridization により決定する必要がある。テトラ、グッピー、トゲウオの各オプシン遺伝子上流域とメダカやゼブラフィッシュの発現調節領域との塩基配列比較を行い、対応する領域をゼブラフィッシュやメダカへの遺伝子導入により機能解析を行っていく必要がある。グッピーの色覚多様性に関して、M/LWS オプシン遺伝子の集団多型解析及び自然選択の検証を進める必要がある。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

1. 0901111518

Takechi, M., Seno, S. and Kawamura, S. Identification of cis-acting elements repressing blue opsin expression in zebrafish UV cones and pineal cells. *J. Biol. Chem.* 283 (46): 31625-31632 (2008).

2. 0911281156

河村正二. 錐体オプシン遺伝子と色覚の進化多様性: 魚類と霊長類に注目して. *比較生理生化学*, 26(3):110-116 (2009).

2) 学会発表

1. Tsujimura T., Chinen, A., Hosoya, T., Masuda, R. and Kawamura, S.: Regulatory mechanisms for the coordinated expression of duplicated green-sensitive and red-sensitive opsin genes in zebrafish and their evolution. Annual Meeting of the Society of Molecular Biology and Evolution (SMBE) 2008, Palau de Congressos de Barcelona, Barcelona, Spain, June 5-8, 2008.
2. Kawamura, S.: Evolutionary diversification of visual opsin subtypes in fish and primates: spectral differentiation, expression patterning and natural selection. The Asia-Pacific Conference on Vision (APCV 2008): Comparative Colour Vision, Brisbane Convention Centre, Brisbane, Australia, July 18-21, 2008.
3. 手塚あゆみ、笠木聡、河村正二、van Oosterhout, C.、河田雅圭: グッピー (*Poecilia reticulata*) における LWS オプシン遺伝子座の多型維持機構. 第 10 回日本進化学会、東京大学駒場キャンパス、東京、2008 年 8 月 22-24 日.
4. 辻村太郎、武智正樹、知念秋人、細谷知広、瀬野究理、増田亮

- 子、河村正二: ゼブラフィッシュを用いた錐体オプシン遺伝子発現制御領域の同定とその進化多様性. 第 10 回日本進化学会、東京大学駒場キャンパス、東京、2008 年 8 月 22-24 日.
5. 河村正二、松本圭史、知念秋人: 祖先配列推定によるオプシン吸収波長の進化的推移の復元. (ワークショップ 9: 祖先遺伝子、タンパク質再構築による進化史研究: 主催、小川智久・山岸明彦) 第 10 回日本進化学会、東京大学駒場キャンパス、東京、2008 年 8 月 22-24 日.
6. 河村正二、武智正樹、瀬野究理: ゼブラフィッシュ紫外線視細胞と松果体で青型オプシン遺伝子の発現を抑制する新規制御領域の同定. 第 80 回日本遺伝学会、名古屋大学工学部 IB 電子情報館、名古屋、2008 年 9 月 3-5 日.
7. Tsujimura T., Takechi, M., Chinen, A., Hosoya, T., Seno, S., Masuda, R. and Kawamura, S.: Evolutionary conservation and diversification of cis-regulatory mechanisms studied through cone opsin genes of zebrafish. The 16th CDB Meeting: Cis Sequence Regulation and Its Evolution, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, Japan, September 29 - October 1, 2008.
8. 手塚あゆみ、笠木聡、河村正二、van Oosterhout Cock、松島野枝、河田雅圭: グッピーの色覚の多様性の維持機構の解明. 第 56 回日本生態学会、岩手県立大学、盛岡、2009 年 3 月 17 ~ 21 日.
9. 村田和人、笠木聡、河村正二、松島野枝、河田雅圭: グッピー (*Poecilia reticulata*) における LWS オプシン遺伝子が個体の光感受性に与える影響. 第 56 回日本生態学会、岩手県立大学、盛岡、2009 年 3 月 17 ~ 21 日.
10. Miyazaki, T., Iwami, T., Yamauchi, M., Yamauchi, S., Shimizu, R., Kasagi, S., Nakata, M. and Kawamura, S.: Retinal histology and molecular basis color vision in 0-2 age-class *Champocephalus gunnari* (Channichthyidae). The Xth SCAR International Biology Symposium, Conference hall, Hokkaido University, Sapporo, Japan, July 26-31, 2009.
11. 手塚あゆみ、笠木聡、河村正二、van Oosterhout Cock、松島野枝、河田雅圭: グッピーの LWS 遺伝子を用いた色覚の多様性の維持機構の解明. 第 11 回日本進化学会、北海道大学、札幌、2009 年 9 月 2 ~ 4 日.