

福岡国際集団遺伝学シンポジウム予稿集

脊椎動物における色覚の分子基盤

横山昌三

*Syracuse University, Department of Biology, Biological Research Laboratories, 130
College Place, Syracuse, NY 13244,*

(1999年11月8日受領、1999年11月8日受理)。

視覚色素は視覚をつかさどり、最大吸収波長 (λ_{\max}) によって特徴づけられる。視覚色素の λ_{\max} 値の変化によって、生物は多様な光環境に適応できるようになった。培養細胞を用いたこれらの視覚色素の機能アッセイが利用可能であることから、視覚は脊椎動物における色覚の適応と遺伝の分子基盤を研究するための理想的な遺伝系となっている。脊椎動物の網膜に存在する視覚色素は、進化的に異なる5つのグループRH1 ($\lambda_{\max} = 490 - 500 \text{ nm}$)、RH2 (470 - 510 nm)、SWS1 (360 - 420 nm)、SWS2 (440 - 455)、およびLWS/MWS (510 - 570 nm) に区別される。

nm)。ここでは、これらの視覚色素の λ_{\max} 値のシフトに関連するアミノ酸置換について概説する。

いくつかのRH1色素の λ_{\max} シフトは、生物の青色環境への適応的变化を反映しているようであり、そのほとんどはアミノ酸によって説明される。

D83N (残基83でD→N)、E122Q、A292Sに置換。同様に、青色RH2色素の λ_{\max} 値のシフトは、D83N、E122Qで説明できる、A164S、M207L。鳥類のSWS1色素については、S84Cの1つのアミノ酸置換のみが紫色素からの紫外色素の変換に関与しているようである。LWS/MWS色素については、180, 197, 277, 285, 308のアミノ酸の違いによる相加効果で、脊椎動物の広い範囲における赤-緑の色変化を完全に説明している。これらの観察結果はすべて、現存する視覚色素の進化は、ごく少数の部位のアミノ酸置換によって説明できることを示唆している。

視覚色素はGタンパク質共役型受容体の一群で、視覚興奮を引き起こす (Wald 1968)。それぞれの視覚色素は膜貫通タンパク質であるオプシンと発色団である11-シス-レチナールからなり、最大吸収波長 (λ_{\max}) によって特徴づけられる。人間の色覚は、「青」、「緑」、「赤」の視覚色素によって媒介されている。青色色素は約370 nmから570 nmの波長を吸収し、 λ_{\max} は420 nmにある。一方、'緑色'色素と'赤色'色素は、それぞれ530 nmと560 nmの λ_{\max} 値で、

約450 -620 nmの波長に敏感である (Nathans 1989)。脊椎動物におけるこれらの色素やその他の視覚色素のスペクトル同調の分子的基盤は、まだよくわかっていない。しかし最近になって、この問題に関して大きな進展があった。

視覚色素の機能的特性のメカニズムを評価するために、ウシの桿体-特異的視覚色素 (ロドプシン) に、視覚科学者のいくつかのグループによって多数のアミノ酸変化が導入されてきた (総説は横山1997を参照)。これらの解析のほとんどでは、荷電アミノ酸が考慮されている。例えば、残基113のグルタミン酸 (E113) をグルタミン (E113Q) にアミノ酸置換すると、色素の λ_{\max} は500 nmから380 nmにシフトする (Sakmarら 1989; Zhukovsky and Oprian 1989; Nathans 1990a, b)。E113はプラスに荷電したプロトン化シッフ塩基のマイナスに荷電した対イオンであり、このオプシン構造の改変は顔料の λ_{\max} 値の劇的なシフトを引き起こす。残念なことに、E113Qを含むこれらのアミノ酸の変化のほとんどは

は自然界では見つかっていない。したがって、これらの突然変異誘発の結果が、自然界における視覚色素の λ_{\max} 値の分岐の分子基盤を解明する上でどのように役立つかは、すぐにはわからない (Yokoyama 1995, 1997)。

幸いなことに、分子進化学的手法はしばしばこの問題を軽減する (Yokoyama and Yokoyama 1990; Yokoyama 1995, 1997; Yokoyama et al.) 視覚色素の配列データを解析することにより、 λ_{\max} 値をシフトさせる可能性のある重要なアミノ酸置換を同定することができる。重要なことは、これらのハイパーチは突然変異誘発実験を行うことで厳密に検証できることである。我々は様々な光環境に対する視覚色素の機能適応の過程を研究しているので、解析は分子レベルでの自然選択も解明することになる。以下では、このような解析について、薄明視、紫外線 (UV) 視、赤緑色視を例に説明する。

背景情報

視覚色素の系統関係。脊椎動物の網膜に存在する視覚色素は、大きく5つのグループに分類される;

2) RH2クラスター (470-510 nmに λ_{\max} 値を持つ顔料の混合物)、3) SWS1クラスター (360-420 nmに λ_{\max} 値を持つ短波長感受性顔料から成る)、4) SWS2クラスター (440-455 nmに λ_{\max} 値を持つSWS顔料から成る); 5) LWS/MWSクラスター (510-570 nmに λ_{\max} 値を持つ長波長または中波長選択性色素からなる) (Yokoyama 1994, 1995, 1997; Yokoyama and Yokoyama 1996; Okano et al. 1992; Hisatomi et al. 1994も参照)。

これらの網膜色素の系統関係は、しばしば (((RH1, RH2) SWS2SWS1) LWS/ MWS)で与えられることが多い (例えば横山1997参照)。視覚色素の5つのグループには、それぞれさまざまな脊椎動物の色素が含まれているので、すべての脊椎動物の祖先は、これら5種類の視覚色素をすべて持っていたに違いない (横山・横山 1996)。

視覚色素のスペクトル同調を理解するための進化的アプローチ。色覚の分子メカニズムは4つのステップで解明できる: 1) オプシン遺伝子のクローニングと分子的特徴づけ、2) 視覚色素の λ_{\max} 値の決定、3) 視覚色素の λ_{\max} 値をシフトさせる可能性のある潜在的に重要なアミノ酸の変化の同定、4) ステップ3で同定されたこれらの変異の実際の効果の決定。

ステップ3では、まず視覚色素の進化木を構築するか利用し、その進化木におけるアミノ酸置換と λ_{\max} -shiftを推測する。特定のアミノ酸置換と λ_{\max} -shiftを関連付けることで、潜在的に重要なアミノ酸置換を特定することができる。この手順では、主に高度に保存された部位を考慮する。なぜなら、進化的保存はしばしば機能的な重要性を意味するからである (Yokoyama 1994, 1995)。

機能アッセイでは

脊椎動物の色覚
 ステップ2と4では、培養細胞で適切なオプシンを発現させ、11-スス-レチナールで再構成し、抗体を用いて精製し、得られた視覚色素の λ_{\max} 値を測定することにより、野生型と変異型色素を再生することができる（詳細は横山2000aを参照）。

変異誘発の結果

これまでのところ、ウシのロドプシンをはじめとする視覚色素の130以上の残基に、大半の単一および複数のアミノ酸変化が導入されている（図1）。このうち、自然集団で検出された実際の多型に基づく変異体はごく少数である。これらの変異は、哺乳類（Nathans 1990a, b; Chan et al. 1992; Merbs and Nathans 1993; Asenjo et al. 1994; Sun et al. 1997; Fasick and Robinson 1998）や魚類（Yokoyama et al. 1995, 1999）の視覚色素に組み込まれている。これまでのところ、これらの突然変異誘発実験から、わずか10ヶ所のアミノ酸の変化が、視覚色素の λ_{\max} に5nm以上のシフトを引き起こすことが示されている（図1）。10残基のうち9残基は膜貫通領域に位置している。これは、発色団が膜貫通領域の内側に埋め込まれており、発色団とオプシンが相互作用することができるからである（Hargrave et al. 1983; Baldwin 1993, 1994; Schertler et al.）変異体4は膜貫通領域の外側に位置しているが、塩化物結合部位が失われたために、ヒトの赤ブタでは28nmのブルーシフトを起こす（Sun et al. 1997）。

これらの突然変異誘発実験から、マグニ
 同一または逆のアミノ酸変化によって引き起こされる λ_{\max} シフトの大きさは、視覚ブタのアミノ酸のバックグラウンド組成によって大きく異なる可能性がある。例えば、図1の変異体10では、 λ シフトの大きさは、アミノ酸の組成によって大きく異なる。

顔料の λ_{\max} シフトは、変異の方向（A→SまたはS→A）および使用される顔料の種類によって、8～28nmの範囲である。

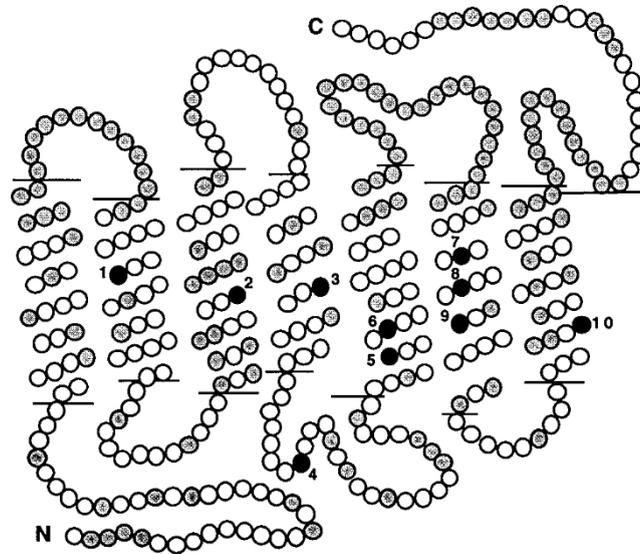


図1.部位特異的変異導入の結果をまとめたもの。 λ_{\max} 値を5nm以上シフトさせるアミノ酸変化(1-10)を黒丸で示す。変化しないか、あるいは λ_{\max} 値が5 nm未満しか変化しないものは、帯状の円で示す。後者の変異体群は、様々な著者によりウシロドプシンを用いて構築されている。データ出典: 変異体1 (ウシロドプシンのD83N (-6 nm)、Nathans 1990a、b); 2 (ウシロドプシンのE122Q (-19 nm)、Nathans 1990a、b; シーラカンスのRH1 (10 nm) およびRH2 (13 nm) 顔料のQ122E、Yokoyama et al.1999); 3 (ヒトLWS顔料のS180A (-7 nm)、Asenjo et al.1994); 4 (ヒトLWS色素のH197Y (-28 nm)、Sun et al. 1997); 5 (シーラカンスRH2色素のL207M (6 nm)、Yokoyama et al. 1999); 6 (ウシロドプシンのH211C (-5 nm)、Nathans 1990a); 7 (ウシロドプシンのF261Y (10 nm)、Chan et al.1992; ヒトLWS色素のY277F (-10nm)、Asenjoら、1994; キャベフィッシュRH1色素のY261F (-8nm)、Yokoyamaら、1995); 7 (ウシロドプシンのF261Y (10nm)、Chanら、1992; ヒトLWS色素のY277F (-10nm)、Asenjoら、1994; キャベフィッシュRH1色素のY261F (-8nm)、Yokoyamaら、1995); 8 (ウシロドプシンのW265Y (-15nm)、Nakayama and Khorana 1991); 9 (ウシロドプシンのA269T (14nm)、Chan et al.1994); および10 (ウシロドプシンのA292S (-10 nm)、Sunら、1997; マウスMWS色素のS303A (18 nm)、Sunら、1997; シーラカンスRH1色素のS292A (8 nm)、Yokoyamaら、1999; イルカMWS色素のS292A (28 nm)、Fasick and Robinson 1998)。

RH1色素。現在、 λ_{\max} 値がわかっている30種類のRH1色素を同定することができる(表1)。RH1顔料の系統樹を考えると(図2)、さまざまな枝にD83N、E122Q、A292Sの3つの重要なアミノ酸置換があることがわかる。ウシのロドプシンでは、これらの変化によって、 λ_{\max} 値がそれぞれ6 nm(図1の変異体1)、19 nm(変異体2)、10 nm(変異体10)青色側にシフトする。部位83、122、292はすべて膜貫通領域に位置している(図3)。図2からわかるように、ほとんどのRH1色素の λ_{\max} 値は約500 nmにある。しかし、アナゴ、ウミタナゴ、金魚、ジョン・ドリー、シーラカンス、カメレオン、イルカの視覚色素の λ_{\max} 値は、約10-20 nm青色側にシフトしている。ヤツメウナギの色素を除いて、3つのアミノ酸置換はこれらの青色シフトと非常に関連し

ていることに注意されたい。したがって、これらのアミノ酸置換が7つの視覚色素の λ_{\max} 値のブルーシフトを引き起こしたことが強く疑われる。ヤツメウナギの色素では、 λ_{\max} シフトに対するD83Nの影響は、他のアミノ酸置換によって元に戻った可能性がある。

アナゴ、ウミタナゴ、ジョン・ドリー、シーラカンス、ドルフィンはずべて水生環境に生息し、その生息環境は薄暗い青色光に支配されている。従って、これらの動物のRH1色素が、青色光を吸収し、青色光を吸収するようになったと考えられる。

カメレオンの色素の λ_{\max} 値がブルーシフトする原因は、^{脊椎動物の色覚}

、海洋生物の色素とは大きく異なる可能性がある。カメレオンの色素の λ_{\max} 値がブルーシフトする原因は、海洋生物の色素とは大きく異なる可能性がある。すなわち、発色団として11-cis-レチナールではなく11-cis-3,4-デヒドロレチナールを持ち（Provencio et al. 1992）、その結果、より長い波長を吸収する（Whitmore and Bowmaker 1989; Harosi 1994）。したがって、カメレオンの色素はブルーシフトした λ_{\max} 値を達成し、約500 nmの λ_{\max} を達成したように見える。しかし、金魚の色素の λ_{\max} のブルーシフトはすぐにはわからない。

これまでのところ、3つのアミノ酸置換のうち2つが λ_{\max} シフトに及ぼす実際の影響は、シーラカンス色素のみを用いてテストされている。単一変異Q122EとS292A、および二重変異Q122E/S292Aをシーラカンス色素に導入した場合、変異体の λ_{\max} 値はそれぞれ495nm、493nm、511nmであった（Yokoyama et al.）このことは、E122QとA292Sが一緒になって λ_{\max} 値を25 nm青色側にシフトさせ、シーラカンス色素の λ_{\max} 値の青色シフトが観察されたことを完全に説明できることを示唆している。

RH2色素。RH2色素はRH1色素と進化的に最も近縁である。我々はRH2色素を同定することができる。

表1. 脊椎動物の視覚色素のアミノ酸配列と λ_{max} 値の出典

グループ	顔料	ジェンバンク	λ_{max} 値の参考値	
RH1	マリーナランプリ (P500)	U67123	ハロシとクラインシュミット (1993)	
	リバーランプリ (P500)	M63632	久富ら (1991)	
	スケート (500ペソ)	U81514	コーンウォール他 (1989)	
	川うなぎ (P502)	L78007	ホープら (1997)	
	海うなぎ (P482)	L78008	ホープら (1997)	
	穴子 (P487)	S82619	アーチャーと平野 (1996)	
	キャベフィッシュ (P503)	U12328	横山ら (1995)	
	金魚 (P492)	L11863	ジョンソンら (1993)	
	コイ (P499)	S74449	CrescitelliとDartnall (1954年)	
	ジョン・ドリー (P492)	Y14484	ダートナールとリスゴー (1965年)	
	サンドゴビー (P501)	X62405	アーチャーら (1992)	
	グッピー (500ペソ)	Y11147	シュヴァンツァーラ (1967年)	
	モスキートフィッシュ (P505)	Y11146	アーチャーと平野 (1997)	
	シーラカンス (P495)	AF131253	横山ほか (1999)	
	ヒョウガエル (P502)	S49004	ピトラー他 (1992)	
	ウシガエル (500ペソ)	S79840	萱田ほか (1995)	
	ツメガエル (P502)	L07770	バトニ他 (1996)	
	サラマンダー (P506)	U36574	チェン他 (1996)	
	アリゲーター (P499)	U23802	ウォルト他 (1957)	
	カメレオン (P491)	L31503	川村・横山 (1998)	
	チキン (P503)	D00702	岡野他 (1992)	
	ピジョン (P502)	AF149230	川村ほか (1999)	
	マウス (P498)	M55171	ブリッジズ (1959年)	
	ラット (P498)	Z46957	ブリッジズ (1959年)	
	犬 (P508)	X71380	ジェイコブズ (1993)	
	牛 (P500)	M21606	オプリアン他 (1987)	
	ドルフィン (P488)	AF055456	ファシク他 (1998)	
	ウサギ (P502)	U21688	ブリッジズ (1959年)	
	マカク (500ペソ)	S76579	ボウメイカー他 (1980)	
	ヒト (P497)	U49742	CrescitelliとDartnall (1953年)	
	RH2	金魚 (P511)	L11865	ジョンソンら (1993)
		金魚 (P506)	L11866	ジョンソンら (1993)
		シーラカンス (P478)	AF131258	横山ほか (1999)
		チキン (P508)	M92038	岡野他 (1992)
		ピジョン (P503)	AF149232	川村ほか (1999)
		カメレオン (P495)	AF134189	川村・横山 (1998)
		ヤモリ (P467)	M92035	小島ら (1992)
		SWS1	ゼブラフィンチ (358)	-
	カナリア (P366)		-	ダス他 (1999)
	インコ (P371)		Y11787	ウィルキー他 (1998)
	ピジョン (P393)		AF149234	横山ら (1998)
	チキン (P415)		M92039	岡野他 (1989)
	LWS/MWS	猫 (P553)	AF132040	横山・ラドルウィマー (1999)
		馬 (P545)	AF132043	横山・ラドルウィマー (1999)
		鹿 (P531)	AF132041	横山・ラドルウィマー (1999)
		モルモット (P516)	AF132042	横山・ラドルウィマー (1999)
		リス (P532)	AF132044	横山・ラドルウィマー (1999)
		ヤギ (P553)	U67999	ラドルヴィマー・横山 (1997)
ウサギ (P509)		AF054235	ラドルヴィマー・横山 (1998)	
マウス (P508)		AF011389	孫他 (1997)	
ラット (P509)		AF054241	ラドルヴィマー・横山 (1998)	
ドルフィン (P524)		AF055457	ファシク他 (1998)	
ヒト (P530)		K03490	オプリアン他 (1991)	
ヒト (P552)		M13300 ^a	メルブスとナタンス (1992)	
ヒト (P560)		M13300	オプリアン他 (1991)	

^aWinderickxら (1992) も参照のこと。

Pの後の数字は λ_{max} 値を示す。アリゲーター, *Alligator mississippiensis*; ウシ, *Bos taurus*; ウシガエル, *Rana catesbeiana*; コイ, *Cyprinus carpio*; カナリア, *Serinus canaria*; ネコ, *Felis catus*; キャベフィッシュ, *Astyanax fasciatus*; カメレオン, *Anolis carolinensis*; ニワトリ, *Gallus gallus*; ツメガエル, *Xenopus laevis*; シーラカンス (*Latimeria chalumnae*); アナゴ (*Conger conger*); シカ (*Odocoileus virginianus*); イヌ (*Canis familiaris*); イルカ (*Tursiops truncatus*); ヤモリ (*Gekko gekko*); ヤギ (*Capra hircus*); 金魚 (*Carassius auratus*); モルモット (*Cavia porcellus*); グッピー (*Poecilia reticulata*); ウマ (*Equus caballus*); ヒト, ホモ・サピエンス; ジョン・ドリー, ゼウス・フェイバー; ヒョウガエル, ラナ・ピピエンス; マカク, マカカ・ファンキュラー; ウナギ, アンギラ・アンギラ; ヤツメウナギ, ランプテラ・マリナス; 蚊魚, ガンブシア・アフィニス; マウス, ムササビ; インコ, メロブシタクス・ウンデュラタス; ハト, コロンバ・

脊椎動物の色覚

リビア; ウサギ (*Oryctolagus cuniculus*)、ネズミ (*Rattus norvegicus*)、ウナギ (*Anguilla anguilla*)、ヤツメウナギ (*Lamptera japonica*)、サンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*)、ハゼ (*Pomatoschistus minutus*)、スケート (*Raja erinacea*)、リス (*Sciurus carolinensis*)、ゼブラフィンチ (*Taeniopygia guttata*)。

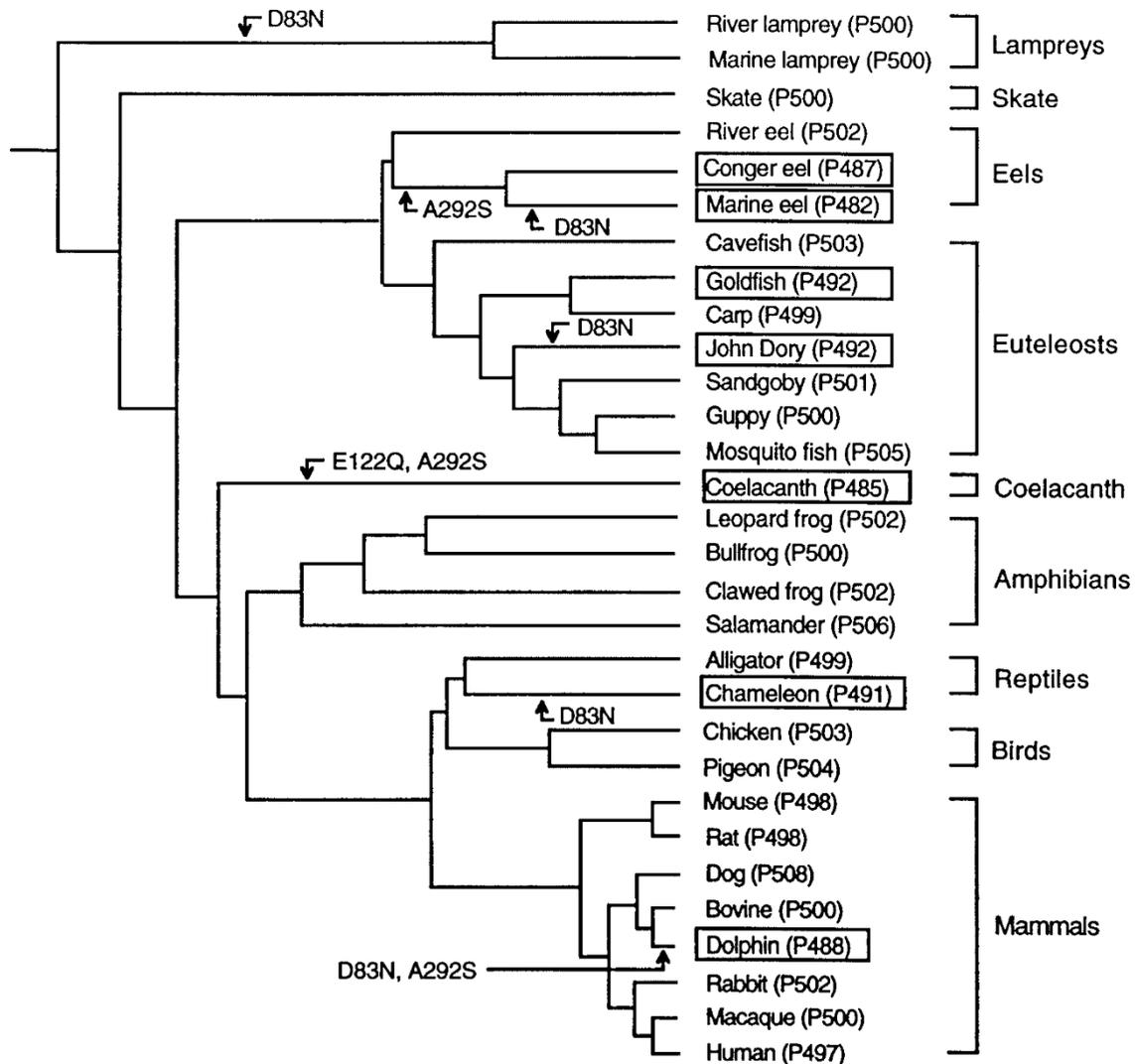


図2.祖先のRH1色素において、矢印で示した高度に保存された残基のアミノ酸置換（Yokoyama 2000b）。 λ_{\max} 値が青くシフトした色素を長方形で示す。樹のトポロジーは主に生物樹に基づいており、ウナギ、真弓類、両生類、哺乳類内の詳細な系統関係は、整理したアミノ酸配列データにNJ法（Saitou and Nei 1987）を適用して得られた。

λ_{\max} シフトに関連する4つのアミノ酸置換D83N、E122Q、M207L、A164Sを同定した（図4）。すでに見たように、D83NとE122Qは λ_{\max} のブルーシフトを引き起こすことが知られている（図1）。また、A164Sがウシロドプシン（Chan et al. 1992）とヒトMWS色素（Asenjo et al. 1994）の λ_{\max} 値に2nmの赤色シフトを引き起こすことも知られている。後述するように、M207Lはシーラカンス色素の λ_{\max} のブルーシフトを引き起こす。これら4つの変異も発色団の近くに位置している（図3）。

図4は、四肢動物の祖先の色素でE122Qが起り、続いてシーラカンス、カメレオン、ヤモリの色素でそれ

ぞれ独立したアミノ酸置換M207L、A164S、D83Nが起こったことを示している。これらのうち、アミノ酸置換の影響は

シーラカンス色素を用いてE122QとM207Lについての
み試験した。Q122EとL207Mの単一変異、および
Q122EとL207Mの二重変異をシーラカンス色素に導入
すると、変異体の λ_{\max} 値はそれぞれ491nm、484nm、
499nmとなる（Yokoyama et al.）したがって、この2つ
のアミノ酸置換は、シーラカンスRH2色素のブルーシ
フトした λ_{\max} 値を再び完全に説明する。E122QはRH1
およびRH2グループでそれぞれ独立に起こり、シーラ
カンスのRH1色素（10 nm）とRH2色素（13 nm）の
 λ_{\max} シフトに対するそれらの影響はわずかに異なるこ
とに注意すべきである（図1）。

こうして、いくつかのRH2色素の λ_{\max} 値のブルーシ
フトの分子基盤を推測することができる。しかし、進
化的解析はまた新たな問題を引き起こす。E122Qは祖
先のRH2色素の

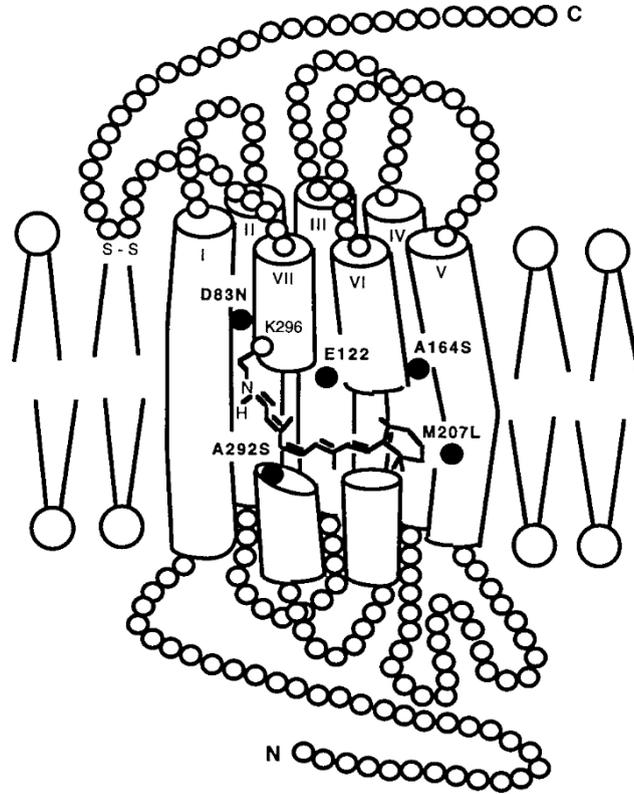


図3.RH1色素群のD83N、Q122E、A292SとRH2色素群のD83N、Q122E、A164S、M207Lのアミノ酸置換位置。ウシのロドプシンのモデルはApplebury (1990)から引用したもので、7つの膜貫通らせんと、臓器内アミノ末端、II-III、IV-V、VI-VIIループ、および細胞質内カルボキシ末端、I-II、III-IV、V-VIループも示されている。11-*cis*-レチナールはK296に結合している。

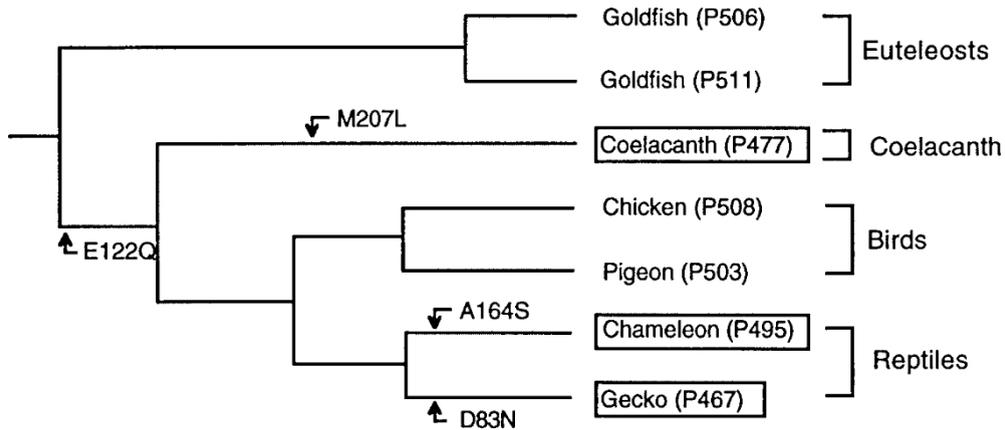


図4. 祖先のRH2色素に高度に保存された残基のアミノ酸置換 (Yokoyama 2000b)。

(図4)、祖先の色素の λ_{max} 値が大きくブルーシフトした可能性が高い。その後、鳥類のRH2色素では、 λ の最大値が赤に戻ったに違いない。この事象の妥当性と、この過程に参与するメカニズムを研究する必要がある。

鳥類の紫外線色素。SWS1色素の λ_{max} 値は360nm (紫) から420nm (紫) である。特に、鳥類は紫外線が紫色の色素を持っており、紫外線視覚の分子基盤を研究するのに最適な対象であると思われる。現在のところ、シマエナガ、カナリア、インコのSWS1色素は紫外線に敏感であることが分かっている。

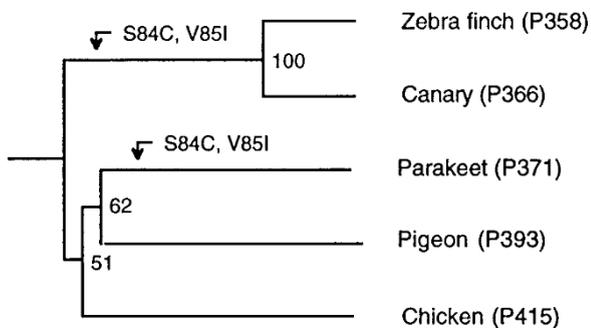
メントはバイオレットに敏感である（表1）。これらの色素の系統樹を見ると、シマエナガとカナリアの色素は近縁であることがわかるが、インコの色素の系統的な位置づけは解決できない（図5）。

鳥類のSWS1色素のアミノ酸配列を比較すると、C84とI85（ゼブラフィンチ色素の残基番号に続く）は、ゼブラフィンチ、カナリア、インコのUV色素にのみ共通であることがわかった。しかしながら、ニワトリとハトの色素を含む、事実上すべてのオルソログSWS1色素体は、対応する残基にSとVを持っている。従って、鳥類ではC84とI85は紫外線感受性と高い相関関係がある。シマエナガヒワの色素に単一変異C84Sと二重変異C84S/V85Iを導入すると、変異体はそれぞれ397 nmと401 nmの λ_{max} 値を示し、いずれも紫感性を獲得した（S. Yokoyama, N. S. Blow and F. B. Radlwimmer, unpublished result）。このことは、紫外線色素をバイオレット感受性にするには、C84Sの変異1つで十分であることを示している。SWS1色素の大部分はS84とI85を持つことから、S84CとI85Vは祖先の紫色素に生じた可能性が高く、鳥類の紫外線色素は紫色素から進化したことが示唆される。残念ながら、パラキート色素の系統的な位置の解像度が低いため、アミノ酸置換S84CとV84Iが3羽の鳥の共通祖先において1回起こったのか、それともゼブラフィンチ／カナリア系統とインコ系統で別々に2回起こったのかを決定することはできない（図5）。部位84は第2膜貫通領域に位置し、発色団に非常に近いことに注意すべきである。

すでに示したように、他のオルソログのUVブタ金魚（*Carassius auratus*）、カメレオン、マウス、ラットなどの種のメントはすべて、SとVが対応する部位にある。このように、鳥類とその他の脊椎動物における紫外線視力は、まったく異なる分子メカニズムによっ

て独立して達成されたようである。

図5. 祖先の鳥類SWS1色素の高度に保存された残基におけるアミノ酸置換。系統樹は、整列されたアミノ酸配列データにNJ法を適用し、ポアソン補正を加えて構築した。異なるノードの横の数字は、1,000ブートストラップ複製（Felsenstein 1985）によって生成されたクラスタリング支持率である。



赤と緑の色覚赤緑の色覚の分子基盤を研究するために

、ヒトとメキシコカナヘビギンポのLWS色素とMWS色素のアミノ酸配列が比較された（横山と横山 1990）。この進化的解析から、2種のLWS色素とMWS色素は、独立したオプシン遺伝子の重複と、それに続くヌクレオチド置換によって派生したことが示唆された。また、ヒトと魚類のLWS色素は、（ヒトのLWS色素とMWS色素の置換番号に従った）A180S、F277Y、A285Tの3つの同一のアミノ酸置換によって、MWS色素から独立に進化したことが示唆された（Neitzら、1991も参照）。ウシロドプシンの3つの対応するアミノ酸変化A164S、F261Y、A269Tは、それぞれ λ_{\max} 値を2nm、10nm、14nm増加させ(Chan et al. 1992)、LWS色素とMWS色素の λ_{\max} 値の差の大部分を説明した。ヒトのMWS色素とLWS色素に変異を導入しても本質的に同じ結論に達したが、30nmの λ_{\max} シフト全体には、さらに4つの残基のアミノ酸の違いによるわずかな寄与が必要であった(Asenjo et al. 1994)。この「3サイト」ルールは、多くのLWSおよびMWS色素に当てはまる（Yokoyama 1997）。しかし最近、このルールの例外がいくつか発見された。すなわち、A180、Y277、T285を持つマウス、ラット、ウサギのオルソログ色素は、約510nmに λ_{\max} 値を持つ（Sun et al. 1997; Radlwimmer and Yokoyama 1998）。H197YとA308Sの2つのアミノ酸変化が、 λ_{\max} 値の極端なブルーシフトを引き起こすことが判明した（Sun et al. 1997; Radlwimmer and Yokoyama 1998）。このように、赤-緑の色覚は、180、197、277、285、308の5つの部位のアミノ酸に基づいているようである（図6）。すでに述べたように、197残基は膜貫通領域の外側に位置しているが、塩化物結合という重要な機能を持つことが知られている（Sun et al. 1997）。

赤-緑の色覚の「5サイト」ルールの妥当性を検証するために、我々は最近、ネコ、ウマ、灰色リス、オジロジカ、モルモット、および金魚のLWSおよびMWS cDNA の特徴を明らかにした（Yokoyama and Radlwimmer 1999）。これらの哺乳類のcDNAと他の哺乳類のcDNAから再生された視覚色素を表1に示す。5

つの部位のアミノ酸の比較と関連する λ_{\max} 値を重回帰分析にかけた。その結果、S180A, H197Y, Y277F, T285A, A308SはLWS/MWS色素の λ_{\max} 値をそれぞれ7, 28, 7, 15, 16 nm青色側にシフトさせ、逆アミノ酸は同じ程度赤色側に変化させることがわかった（表2）。これらのアミノ酸変化の相加効果によって、哺乳類や、金魚、カメレオン、ハトなどの脊椎動物における赤-緑の色覚が完全に説明される。このように、現在知られている脊椎動物のほぼすべてのLWSおよびMWS色素の分光感度は、「5サイト」規則と完全に一致する。しかし、「5サイト

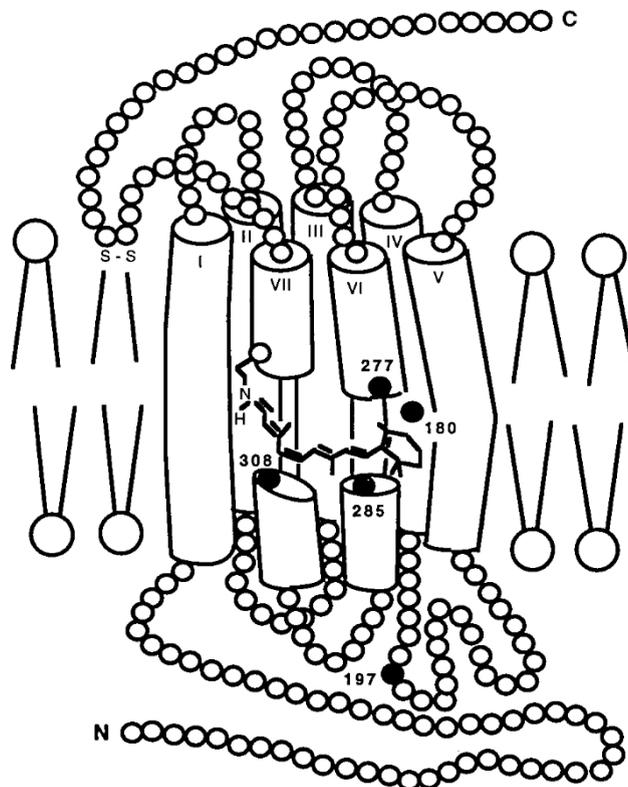


図6.LWS/MWS色素の波長感受性を変化させるのに重要な5つのアミノ酸残基。

表2. 180,197,277,285,308の部位におけるアミノ酸変化の

アミノ酸	λマックスシフト。					
	Z	θ_1	θ_2	θ_3	θ_4	θ_5
シータ	560	-7.3	-28.4	-7.2	-15.1	-15.6
AHFAA	530	7.3	-28.4	7.2	15.1	-15.6
AYYTS	509	7.3	28.4	-7.2	-15.1	15.6

θ_1 、 θ_2 、 θ_3 、 θ_4 、 θ_5 、およびZはそれぞれ、色素全体におけるS180A、H197Y、Y277F、T285A、A308S、およびその他の残基のアミノ酸によって引き起こされる λ_{max} シフトの大きさを表す。負の θ_i 値はアミノ酸が逆方向に変化したことに由来する（Yokoyama and Radlwimmer 1999より改変）。

哺乳類における赤-緑の色覚に関する法則は、その細部においてさらなる修正を必要とするかもしれないが、その妥当性は既存のデータによって強く支持されている。

また、「5サイト」ルールの原理を用いれば、ほ乳類の祖先の赤緑色覚の進化を推測することもできる（Yokoyama and Radlwimmer 1999）。哺乳類の祖先のアミノ酸組成から推測すると、この色素はS180、Y197、

Y277、T285、A308を持ち、531 nmに λ_{max} を持ち、緑に感度を持つ（図7）。哺乳類における最初の赤色視覚は、ヒト、ウサギ、ネコ、ウマ、イルカ、ヤギ、シカの共通祖先の色素で起こったようである（ $\lambda_{max} = 553$ nm）。ヒトのLWSの範囲

色素はこの祖先の色素からA180Sによって進化した。^{S,横山}

LWS色素の62%はS180、H197、Y277、T285、A308からなり、典型的なヒトLWS色素であるが、対立LWS色素の38%はA180であることに注目すべきである(Winderickx et al. 1992)。後者の色素は祖先型であり、552nmに λ_{max} 値を持つ(表1)。興味深いことに、ヒトのMWS色素はY277FとT285Aによってその機能を戻し、現存する緑感性を獲得した。このように、異なる哺乳類の色素が加わったことで、ヒトのMWS色素は、Yokoyama and Yokoyama (1990)が当初示唆したような逆ではなく、祖先のLWS色素から進化したことが示唆された。シカの緑色感受性

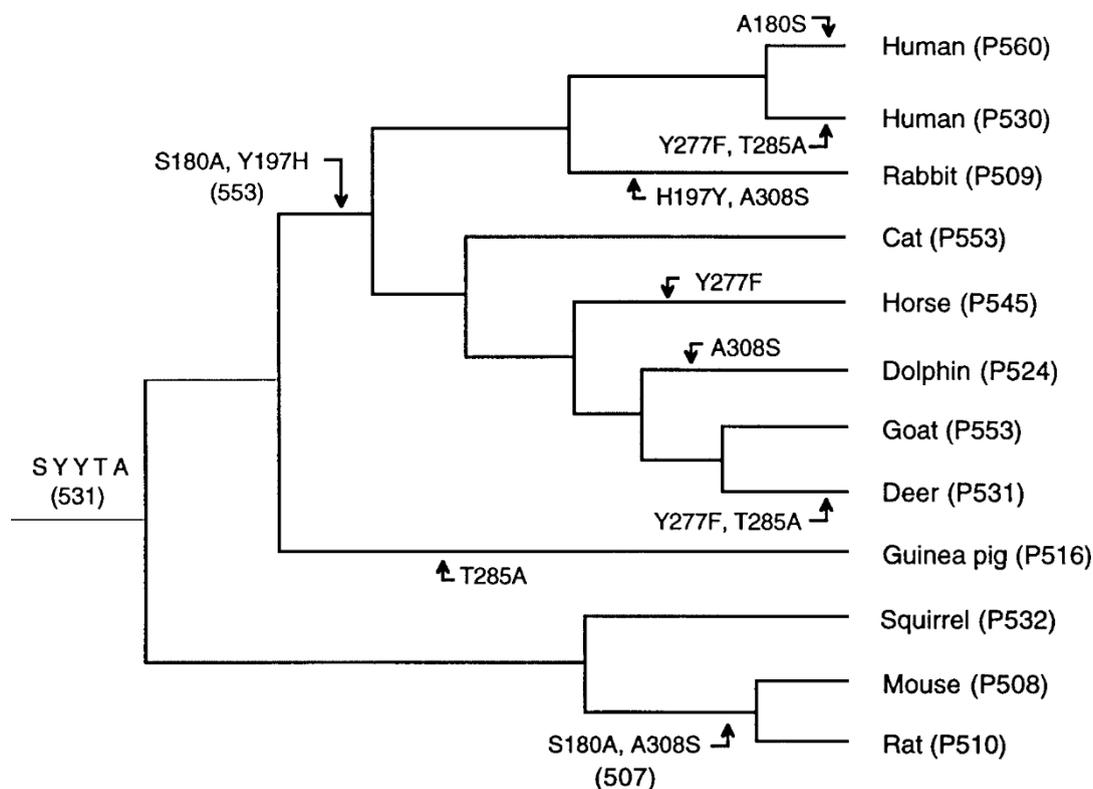


図7.祖先の哺乳類色素の5つの重要残基におけるアミノ酸置換。枝以外の数字は、「5サイト」ルールから予測される λ_{\max} 値である (Yokoyama and Radlwimmer (1999)から改変)。

とイルカは、それぞれY277FとT285AとA308Sによって、祖先のLWS色素から独立に派生したに違いない。

ウサギ、モルモット、マウス、ラットの λ_{\max} 値には極端なブルーシフトが見られ、 λ_{\max} 値は510 nm付近にある。モルモット色素は、T285Aという一つのアミノ酸置換によって、哺乳類の祖先であるMWS色素から緑色感度を獲得したようである。ウサギの色素はH197YとA308Sによって、ネズミの色素はS180AとA308Sによって、祖先のLWS色素から進化した(図7)。これらの結果は、脊椎動物の現存する赤緑色視覚は、わずか数カ所の独立したアミノ酸置換によって達成されたことを強く示唆している。

結論

NathansたちはヒトのRH1、SWS1、LWS/MWSオプシン遺伝子をクローニングし、その特徴を明らかにした(Nathans and Hogness 1984; Nathans et al. 1986)。これらの研究から得られたcDNAクローンを用いて、さまざまな生物種のオプシン遺伝子が単離され、その特徴が明

らかにされた。これらの配列データの比較解析は、視覚色素の λ_{\max} シフトの原因となりうる潜在的に重要なアミノ酸変化を同定するための強力なツールであることが証明された。このようにして同定されたアミノ酸変化に基づく、

(横山ら 1995, 1999) や哺乳類の赤緑色覚 (Chanら 1992; Asenjoら 1994; Sunら 1997) の遺伝的基盤が解明された。

さらなる生物種のアプシン遺伝子の分子的特徴を明らかにすることは、視覚色素の機能に重要なアミノ酸置換を突き止めるのに役立つだろう。比較配列解析に基づく視覚色素の突然変異誘発解析が、さまざまな進化的問題にアプローチする際の一般的な手法になることが期待される。このように、比較データ解析は突然変異誘発実験をデザインするための便利なツールとして利用でき、分子進化はこれまで想像されていたよりもはるかに実用的なものとなるだろう (横山 1995, 1997; 横山・横山 1996)。同時に、これらの突然変異誘発実験は、様々な光環境に対する視覚色素の適応的進化の分子基盤を理解する上で不可欠なツールとなるだろう。

Ruth Yokoyama氏のコメントには大変感謝している。本研究はNIH助成金GM-42379の支援を受けた。

参考文献

Applebury, M. L. (1990) Insight into blindness. *Nature* **343**, 316 - 317.

- Archer, S. N. and Hirano, J. (1996) アナゴの青色感受性桿体視覚色素の吸光度スペクトルと分子構造. *Proc.R. Soc. Lond.B.* **263**, 761-767.
- アーチャー, S. N. と平野, J. (1997) Poeciliid fish の 2 種における桿体視覚色素のオプシン配列. *J. Fish Biol.*
- Archer, S. N., Lythgoe, J. N. and Hall, L. (1992) Rod opsin cDNA sequence from the sand goby (*Pomatoschistus minutus*) compared with those of other vertebrates. *Proc.R. Soc. Lond. B.* **248**, 19-25.
- Asenjo, A. B., J. Rim, J. and Oprian, D. D. (1994) Molecular determinants of human red/green color discrimination. *Neuron* **12**, 1131-1138.
- Baldwin, M. (1993) Gタンパク質共役型受容体におけるらせんの配置の可能性. *EMBO J.* **12**, 1693-1670.
- Baldwin, M. (1994) Gタンパク質と結合した受容体の構造と機能. *Curr.Opn.Cell Biol.*
- バトニ (Batni, S)、スカルツエツティ (Scalzetti, L)、ムーディ (Moody, S. A.)、ノックス (Knox, B. E. (1996) *Xenopus* rhodopsin 遺伝子の構造解析. *J. Biol.Chem.* **271**, 3179-3186.
- Bowmaker, J. K., Dartnall, H. J. and Mollon, J. D. (1980) Microspectrophotometric demonstration of four classes of photoreceptor in an old world primate, *Macaca fascicularis*. *J. Physiol.* **298**, 131-143.
- Bridges, C. D. B. (1959) いくつかの一般的な鳥類哺乳類の視覚色素。 *Nature* **184**, 1727-1728.
- Chan, T., Lee, M. and Sakmar, T. P. (1992) 水酸基を持つアミノ酸の導入がロドプシンの浴色スペクトルシフトを引き起こす：赤-緑色素のスペクトル同調に関わるアミノ酸置換. *J. Biol.Chem.* **267**, 9478-9480.
- Chen, N., Ma, J.-X., Corson, D. W., Hazard, E.S. and Crouch, R. K. (1996) サラマンダー桿体由来のロドプシン遺伝子の分子クローニング. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* **37**, 1907-1913.
- Cornwall, M. C., Ripps, H., Chappell, R. L. and Jones, G. J. (1989) Skate photoreceptors of Membrane current responses. *J. Gen. Physiol.*
- Crescitelli, F. and Dartnall, H. J. A. (1953) Human visual purple. *Nature* **172**, 195-196.
- Crescitelli, F. and Dartnall, H. J. A. (1954) コイ網膜の感光色素。 *生理学雑誌* **125**, 607-627.
- Dartnall, H. J. A. and Lythgoe, J. N. (1965) The spectral clustering of visual pigments. *視覚研究* **5**, 81-100.
- Das, D., Wilkie S. E., Hunt, D. M. and Bowmaker J. K. (1999) Parasserine bird, the Canary, *Serinus canaria* の網膜における視覚色素と油滴：顕微分光光度法とオプシン配列. *Vision Res.* **39**, 2801-2815.
- Fasick, J. I., Cronin, T. W., Hunt, D. M. and Robinson, P. R. (1998) The visual pigments of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Vis.Neurosci.* **15**, 643-651.
- Fasick, J. I. and Robinson, P. R. (1998) イルカの視覚色素におけるスペクトル同調のメカニズム. *生化学* **37**, 432-438.
- Felsenstein, J. (1985) 系統樹の信頼限界：ブートストラップを用いたアプローチ. *Evolution* **39**: 783-791.
- ハーグレイブ, P.A., マクダウエル, J.H., カーティス, D.R., ワン, J.K., ジャスザック, E., フォン, S.L., モハンナ・ラオ, J.K., アルゴス, P. (1983) ウシロドプシンの構造. *Biophys.Structural Mech.* **9**, 235-244.
- Harosi, F. I. (1994) 脊椎動物の視覚色素の2つのスペクトル特性の解析. *Vision Res.* **34**, 1359-1369.
- Harosi, F. I. and Kleinschmidt, J. (1993) ウミヤツメ *Petromyzon marinus* の視覚色素. *Vis.NeuroSci.*
- 久富大智・岩佐貴久・徳永文男・安井章浩 (1991) アイソラ・・・。

- Biochem.Biophys.Res. Commu. **174**, 1125 -1132.
- 久富修・萱田聡・青木靖弘・岩佐毅・徳永文男 (1994) 脊椎動物の視覚色素の系統関係. *Vision Res.* **34**, 3097- 3102.
- Hope, A. J., Partridge, J. C., Dulai, K. S. and Hunt, D. M. (1997) 深海魚の桿体オプシンにおける波長同調のメカニズム. *Proc.R. Soc.B.* **264**, 155 -163.
- Jacobs, G. H. (1993) 哺乳類における色覚の分布と性質. *Biol.* **68**, 413-471.
- Johnson, R., Grant, K. B., Zankel, T. C., Boehm, M. F., Merbs, S. L., Nathans, J. and Nakanishi, K. (1993) 金魚オプシン配列のクローニングと発現. *生化学* **32**, 208-214. Kawamura, S., Blow, N. S. and Yokoyama, S. (1999) ハト (*Columba livia*) の視覚色素の遺伝学的解析. 遺伝学 (インプレス)。
- 川村修一・横山修一 (1998) アメリカカメレオン (*Anolis carolinensis*) の視覚色素と非視覚色素の機能的特徴. *Vision Res.* **38**, 37- 44.
- カエルロドプシン cDNA のクローニングと発現. *Comp.Biochem.Physiol.* **110B**, 599 - 604.
- 小島大介、岡野俊彦、深田祐一郎、七田靖弘、吉澤智之、エベリー T. G. (1992) ヤモリの桿体細胞には錐体視覚色素が存在する. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* **89**, 6841- 6845.
- Merbs, S. L. and Nathans, J. (1992) ヒト錐体色素の吸収スペクトル. *Nature* **356**, 433 - 435.
- Merbs, S. L. and Nathans, J. (1993) ヒト赤色および緑色錐体色素の吸収スペクトルの異なる調整における水酸基含有アミノ酸の役割. *Photochem.Photobiol.* **58**, 706 - 710.
- Nakayama, T. A. and Khorana, G. H. (1991). ウシロドプシンの網膜発色団と相互作用する膜包埋らせん中のアミノ酸のマッピング. *J. Biol.Chem.* **266**: 4269 - 4275.
- Nathans, J. (1989) 色覚の遺伝子. *Sci. Am.* **260**, 42- 49.
- Nathans, J. (1990a) 視覚色素の吸光度の決定: 推定膜貫通セグメントにおける荷電アミノ酸の役割. *生化学* **29**, 937- 942.
- Nathans, J. (1990b) 視覚色素吸光度の決定因子: ウシロドプシン中のレチニリデンシッフ塩基対イオンの同定. *生化学* **29**, 9746 - 9752.
- Nathans, J. and Hogness, D. S. (1984) ヒトロドプシンをコードする遺伝子の単離と塩基配列. *Proc.Natl. Acad.USA* **81**, 4851- 4855.
- Nathans, J., Thomas, D. and Hogness, D. S. (1986) ヒト色覚の分子遺伝学: 青、緑、赤の色素をコードする遺伝子. *Science* **232**, 193 - 201.
- Neitz, M., Neitz, J. and Jacobs, G. H. (1991) 赤緑色覚の基礎となる色素のスペクトル同調. *Science* **252**, 971- 974.
- 岡野高志, 深田洋一, Artamonov, I. D. and Yoshizawa, T. (1989) ニワトリ網膜からの錐体視覚色素の精製. *生化学* **28**, 8848 - 8856.
- 岡野武彦、小島大介、深田祐介、七田勇次郎、吉澤 T. (1992) ニワトリ錐体視覚色素の一次構造: 脊椎動物のロドプシンは錐体視覚色素から進化した. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* **89**, 5932 -5936.
- Oprian, D. D., Asenjo, A. B., Lee, N. and Pelletier, S. L. (1991) ヒト3色覚色素遺伝子の設計、化学合成、発現. *生化学* **30**: 11367- 11372.
- Oprian, D. D., molday, R. S., Kaufman, R. J. and Khorana, H. G. (1987) サル腎臓細胞における合成ウシロドプシン遺伝子の発現. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* **84**, 8874-

- 8878.
- Pittler, S. J., Fliesler, S. J. and Baehr, W. (1992) frog rhodopsin (*Rana pipiens*) の一次構造。FEBS Lett. **313**, 103 - 108.
- Provencio, I., Loew, E. R. and Foster, R. G. (1992) 完全陸棲脊椎動物におけるビタミンA₂ - ベースの視覚色素。Vision Res. **32**, 2201- 2208.
- Radlwimmer, F. B. and Yokoyama, S. (1997) ヤギ (*Capra hircus*) の赤色視覚色素遺伝子のクローニングと発現。遺伝子 **198**, 211- 215.
- Radlwimmer, F. B. and Yokoyama, S. (1998) ウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) とラット (*Rattus norvegicus*) の緑色視覚色素の遺伝子解析。遺伝子 **218**, 103 -109.
- 斉藤直樹、根井正人、1987年。近傍結合法：相同系統樹を再構成する新しい方法。Mol.Biol.Evol. **4**, 406 -425.
- Sakmar, T. P., Franke, R. R. and Khorana, H. G. (1989) グルタミン酸-113はウシロドプシンのレチニリデンシッフ塩基対イオンとして機能する。Proc.Natl. Acad.Sci. USA **86**, 8309 - 8313.
- Schertler, G. F. X., Villa, C. and Henderson, R. (1993) ロドプシンの投影構造。Nature **362**, 770 -772.
- Schwanzara, S. A. (1967) 淡水魚の視覚色素。Vision Res. **7**, 121-148.
- Sun, H., Macke, J. P. and Nathans, J. (1997) Mechanisms of spectral tuning in mouse green cone pigment. Proc.Natl. Acad.Sci. USA **94**, 8860 - 8865.
- Unger, V. M. and Schertler, G. F. X. (1995) 電子凍結顕微鏡によるウシロドプシンの低分解能構造決定。Biophys.J. **68**, 1776 - 1786.
- Wald, G. (1968) 視覚興奮の分子基盤。ネイチャー **219**, 800 - 807.
- Wald, G., Brown, P. K. and Kennedy, D. (1957) The visual system of alligator. J. Gen. Physiol.
- Whitmore, A. V. and Bowmaker, J. K. (1989) Rudd Scadinus erythrophthalmus における錐体感度と短波吸収視覚色素の季節変化。J. Comp.Physiol. **166**, 103 -115.
- ウィルキー、S.E.、ヴィッサーズ、P.M.、ダス、D.、デグリッブ、W.J.、ボウメーカー、J. K. and Hunt, D. M. (1998) The molecular basis for UV vision in birds: spectral characteristics, cDNA sequence and retinal localization of the UV-sensitive visual pigment of the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). Biochem.J. **15**, 541- 547.
- Winderickx, J., Lindsey, D. T., Sanocki, E., Teller, D. Y., Motulsky, A.A. G. and Deeb, S. S. (1992) 赤色光色素の多型が、カラーマッチングのばらつきの根底にある。Nature **356**, 431- 433.
- 横山理恵、Knox, B. E. and Yokoyama, S. (1995) 魚類*Astyanax* のロドプシン：レッドシフトにおけるチロシン261の役割。Invest.Ophthalmol. **36**, 939 -945.
- 横山理恵・横山聡 (1990) 魚類*Astyanax fasciatus* とヒトにおける赤色および緑色類似視覚色素遺伝子の収斂進化。Proc.Natl. Acad.Sci. USA **87**, 9315 - 9318.
- Yokoyama, S. (1994) 脊椎動物における短波長感受性視覚色素の遺伝子重複と進化。Mol.Biol.Evol. **11**, 32 -39.
- Yokoyama, S. (1995) 脊椎動物における視覚色素のアミノ酸置換と波長吸収。Mol.Biol.Evol. **12**, 53 - 61.
- 横山修一 (1997) 適応選択の分子遺伝学的基盤：脊椎動物の色覚の例。Annu.Genet. **31**, 315 -336.
- 横山 進 (2000a) 脊椎動物の色覚に関する系統解析と実験的アプローチ。In: Vertebrate Phototransduction and the Visual Cycle (ed. K. Palczewski) Methods in Enzymology, Academic Press (in press).
- 横山 進 (2000b) シーラカンスの色覚とロドプシン (RH1) およびロドプシン様 (RH2) 色素の適応進化。J. Heredity (in press).
- 哺乳類における赤と緑の色覚の分子遺伝学。Genetics (in press).
- 横山 進、Radlwimmer, F. B. and Kawamura, S. (1998) 脊椎動物の紫外線色素の再生。FEBS Lett. **423**, 155 -158.
- 脊椎動物における視細胞と視覚色素の適応進化。Annu.Rev. Ecol.Syst. **27**, 543 -567.
- 横山 聡・Zhang, H.・Radlwimmer, F. B.・Blow, N. S. (1999) コモランコエラックアカンス (*Latimeria chalumnae*) の色覚の適応進化。Proc.Natl. Acad.Si.USA **96**, 6279 - 6284.
- Zhukovsky, E. A. and Oprian, D. D. (1989) 視覚色素の吸収極大に対するカルボン酸側鎖の効果。Science **246**, 928 - 930.