

脊椎動物視細胞の種間相同性を支える細胞分化メカニズム

小川 洋平

5億年以上前に、脊椎動物の共通祖先は4種類の錐体タイプによる4色型の昼間視と、桿体による薄明視を獲得した。これら視細胞にはそれぞれ独自の光シグナル伝達系が備わり、特徴的な細胞形態を示す。これらの特徴は生物種を超えて高度に保存されており、進化距離の離れた生物においても視細胞を同定することが可能である。その一方で、個々の生物種における視細胞の応答は、生息する光環境に応じて独自に調整されており、視細胞の種類数も劇的に変化している。本総説では、3種の脊椎動物（ゼブラフィッシュとハツカネズミとヒト）において、転写調節因子による視細胞の分化メカニズムを比較し、視細胞の種類が種間で相同であるかどうかを探究する。さらに、魚と哺乳類の共通祖先が保持していたであろう4つの錐体タイプの細胞分化ネットワークが、現生の哺乳類が備える2つの錐体タイプのネットワークへと進化的に移行した経緯を考察する。

1. はじめに

生物は約40億年という長い時間の中でたえず変化し続けている。地球上の生命が広く親類関係にあるとダーウィンが提唱して以降¹⁵⁾、生物学者たちは、現存種の形態学的な比較を行い、共通祖先における表現型や、進化の過程における新奇性の獲得を考察してきた。動物における新奇性獲得の分子的基盤に関しては、近年目覚ましく解読が進んでいるゲノム情報を用いて、表現型と連関するゲノム領域の同定が精力的に行われている^{37, 40)}。しかし、塩基レベルでの変異が動物個体に新奇性をもたらすまでには、依然として大きな隔りがある。

細胞進化は、動物個体レベルの表現型進化とゲノムレベルの変化をつなぐ鍵となる^{4, 38)}。これまで、細胞形態や生理学的応答などの細胞機能に基づいたリンネ式の細胞分類が行われ、生物種を超えて相同な細胞の同定が試みられてきた。しかし、動物個体の進化と同様に、細胞進化においても収斂進化が生じるため、生理学的および形態学的な表現型のみを用いて相同な細胞を見出すことは極めて難しい³⁸⁾。近年、1細胞レベルの遺伝子発現パターンを種間比較することにより、種間において相同な細胞タイプの同定が試みられている⁶⁵⁾。細胞タイプの種間比較を行うためには、細胞生理や細胞形態の知見をもとに、種間における相同性がすでに明確化された細胞タイプをまず用いることで、細胞比較の方法を確立する必要がある。

脊椎動物の網膜は、細胞生理学および細胞形態学的な研究が精力的に行われており、生物種間に相同な細胞を見

出すことが容易な組織のうちの1つである。主要な網膜細胞クラスは、視覚の情報処理を担う5種類の神経細胞（視細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、神経節細胞）と1種類のグリア細胞（ミュラーグリア細胞）によって構成される（図1A）。約5億年の脊椎動物の進化において、これら6種類の網膜細胞の神経接続パターンや細胞形態の特徴は、非常に高く保存されている^{5, 69)}。網膜細胞クラスは、シナプス接続が起きる2つの網状層によって3層に分断され、規則的な配置を示す（図1A）。この網膜の基本骨格に基づいて、シングルセルトランスクリプトーム技術を用いた詳細な発現プロファイリングが実施され、実験技術の有用性が証明された⁴²⁾。

本総説では、網膜細胞の中で最も形態学的そして生理学的な知見が豊富な視細胞に着目する。視細胞は種を超えて保存された特有の細胞形態と光応答性を備えており（次節を参照）^{18, 29, 36)}、非常に高いクラス相同性を示す。その一方で、視細胞は錐体と桿体という2つの視細胞タイプに大別され、それぞれの生物は、生息域の光環境に応じて異なる種類の視細胞を備える。例えば、真骨類は4種類の錐体タイプを備え、哺乳類は2種類の錐体タイプを備える。本稿では、種間相同な視細胞タイプを見出すため、転写調節因子による細胞分化ネットワークを生物横断的に比較する。

2. 脊椎動物の視細胞

光はまず、視細胞の外節において受容される^{18, 29, 36)}（図1A）。外節に存在する光感受性分子である視物質は、Gタンパク質共役型7回膜貫通型受容体タンパク質であるオプシンと、オプシンと共有結合する発色団である11-シス型レチナール (A_1) または11-シス型3,4-ジデヒドロレチナール (A_2) から構成される。光子の吸収によって発色団はシス体からトランス体への異性化を起こす。オプシンの三次元構造の変化により、Gタンパク質を介したシグナル伝達カスケードが開始され、陽イオンチャネルが閉じ、光信号が電気信号に変換される。視物質は、(1) 最大感度を示す光の波長 (λ_{max} として知られる) と (2) 薄明視と明視のどちらに特化しているかによって定義される。視物質の λ_{max} は、オプシンのアミノ酸配列の置換により短波長側または長波長側にシフトし、また、 A_1 発色団を A_2 発色団に置換することにより、 λ_{max} は長波長側にシフトする¹¹⁾。

視細胞は、細胞形態に基づいて2つのグループに大別され、円柱形の長細い外節を持つ視細胞は「桿体」、円錐形の外節を持つ視細胞は「錐体」と呼ばれる。桿体は薄明視に、

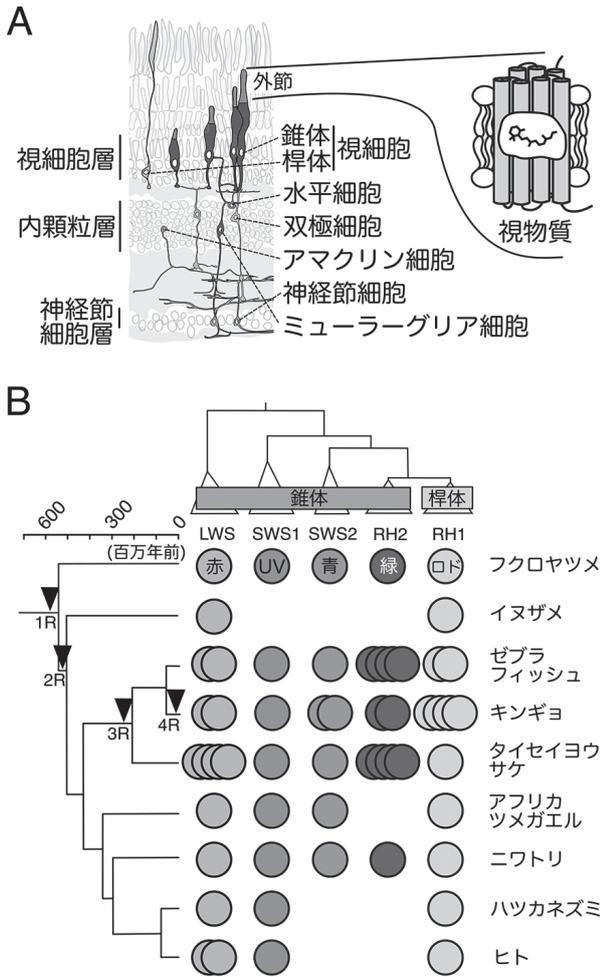


図1 脊椎動物の網膜と視覚オプシン遺伝子 (A) ゼブラフィッシュ網膜の細胞クラスと、視細胞の外節に存在する視物質。Badenらの文献⁵⁾を参考にして網膜の概要図を作図した。(B) 視覚オプシン遺伝子の分子系統樹。全ゲノム重複(1R, 2R, 3R, 4R)が生じた時期を矢頭で示した。それぞれの生物の学名および視覚オプシン遺伝子を参照した文献を以下に示す。フクロヤツメ (*Geotria australis*)¹⁰⁾, イヌザメ (*Chiloscyllium punctatum*)²⁴⁾, キンギョ (*Carassius auratus*)³⁴⁾, タイセイヨウサケ (*Salmo salar*)¹⁹⁾, アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)¹⁷⁾

錐体は明所視に適した光応答特性を示す^{18, 29, 36)}。また、視細胞クラスは分光および発現する視覚オプシンの分子クラスによって分類される。脊椎動物の場合、視覚オプシンは、アミノ酸配列に基づいて5つのクラス(UV: SWS1, 青: SWS2, 緑: RH2, 赤: LWS, ロドプシン: RH1)に分類される^{6, 52, 66, 73)}(図1B)。視覚オプシンの表記はさまざま存在するが、広く用いられている横山らのグループの命名法を本誌説では用いることとする⁷³⁾。ロドプシン(RH1)クラスは薄明視に特化したオプシンをコードし、桿体に発現している。A₁ベースのロドプシンのλ_{max}は475-525 nmの

範囲にある。他の4つのオプシクラスは、明所視に適した錐体オプシンをコードし、A₁ベースの錐体視物質のλ_{max}は一般的に以下の範囲に収まる(SWS1: 360-440 nm, SWS2: 400-480 nm, RH2: 440-530 nm, LWS: 495-575 nm)。錐体オプシンの数および名称は生物種ごとに異なるため、錐体タイプの相同性を議論する場合には注意が必要である。例えばゼブラフィッシュの4つの錐体タイプは、SWS1, SWS2, RH2, およびLWSオプシンをそれぞれ発現し、発現するオプシンのλ_{max}に従って、UV, 青, 緑, および赤錐体と呼ばれる。その一方で、ヒトには「S」, 「M」, 「L」と呼ばれる3つの錐体タイプが存在し、S錐体はSWS1オプシン, M錐体とL錐体は機能分化したLWSオプシン(MWSとLWS)をそれぞれ発現している。ゼブラフィッシュにおいて青と緑のオプシンをコードするSWS2とRH2オプシン遺伝子は、ヒトゲノムには存在しない。

分子系統学的解析に基づいた桿体・錐体に発現するオプシンの進化のシナリオとして以下のものが支持される。4種類の錐体オプシン(UV: SWS1, 青: SWS2, 緑: RH2, 赤: LWS)のなかでは、まず遺伝子重複によって、LWSクラスのオプシンと、短波長側にシフトした第二のオプシンが生み出された。視細胞の進化の初期段階では、広い波長範囲にわたる感度の向上が、オプシンのスペクトル分岐を促す主要な選択圧力であった可能性がある。その後、短波長オプシンが重複してSWS1クラスのオプシンが作られ、さらに2番目の短波長オプシンが重複してSWS2クラスとRHクラスのオプシンが作られた。こうして脊椎動物に共通の祖先は、可視光スペクトルにわたって4つの異なるチューニングが施された視覚オプシンを並べることによって、一様に高い感度を実現した。脊椎動物に共通の祖先はおそらく昼行性であり、紫外光と可視光をいずれも利用可能な浅瀬に生息していたのだろう。最後に、全ゲノム重複による遺伝子倍加により、ロドプシンとRH2オプシンが生じた^{36, 52)}。ロドプシンを発現するオプシンはその後、熱異性化率を低下させるアミノ酸の変化を獲得し、薄明条件で機能する桿体へと細胞進化した。興味深いことに、5億年以上前に分岐した円口類に属すフクロヤツメ (*Geotria australis*) は4種類すべての錐体タイプを保持しており^{10, 70)}, さらには同じく円口類に属すウミヤツメ (*Petromyzon marinus*) の桿体の電気生理応答は脊椎動物のそれと非常に類似している^{44, 58)}。したがって、脊椎動物進化のごく初期において、錐体による4色型の昼間視と、桿体による薄明視がすでに達成されていたと考えられる。

3. 全ゲノム重複による視細胞の多様化

多細胞生物の新奇性の獲得における最も重要なメカニズムは遺伝子重複であり、視覚オプシン遺伝子や、視細胞に専門のGタンパク質シグナル伝達カスケード遺伝子群の獲得はこのプロセスの典型的な例である^{25, 36)}(図2A)。光により活性化された視覚オプシンは、ヘテロ3量体型Gタンパク質を介してヘテロ4量体ホスホジエステラーゼ(PDE)を活性化(図2A)。活性化されたPDEは細胞内のcGMP濃度を低下させ、cGMP依存性の非選択的陽イオンチャネルが閉じることで、視細胞は光を受容して過分極応答を示す。また視細胞には、オプシンキナーゼ、活性化型オプシンに結合するアレシチンなど多数の分子が織りなす、カル

シウム濃度依存的な負の光反応フィードバックシステムが存在し、さまざまな光量に順応した光応答が実現されている。このような脊椎動物型のシグナル伝達システムは、脊椎動物の進化初期に生じた局所的な遺伝子倍加によってすでに基本骨格が完成した^{35, 36)}。その後2度の全ゲノム重複(1Rと2R)を経て光シグナル伝達遺伝子は倍加し、さらにそれぞれの遺伝子に変異が生じた。同時に、それぞれの倍加遺伝子が異なる細胞に発現するように調節され、桿体と錐体への機能分化が完了した(図2)。興味深いことに、2Rが生じる以前に分岐した無顎類のヤツメウナギにおいても、有顎類の桿体と錐体それぞれに応答特性が類似した2種類の視細胞が存在する^{44, 58)}。したがって、1Rを経た無顎類と有顎類の共通祖先において、視細胞はすでに桿体と錐体へと機能分化していたと考えられる。さらに2Rを介してシグナル伝達コンポーネントを追加で獲得することにより、有顎類の錐体と桿体システムは完成した。実際、2Rを経た有顎類が持つ光シグナル伝達コンポーネントの一部は、無顎類のゲノムにコードされていない³⁵⁾。

脊椎動物の進化初期に生じた2度の全ゲノム重複以後も、ある特定の系統群においてはさらなる全ゲノム重複が生じた(図1B)。真骨類の進化初期には、三度目の全ゲノム重複(3R)が生じ(図1B)²³⁾、ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)成魚においては、3Rにより倍加した光シグナル伝達パラログ遺伝子が、それぞれ別の視細胞タイプに発現することが明らかとなった⁴⁸⁾。たとえば、錐体型のアレスチンARR3のオルソログであるArr3aとArr3bの場合、Arr3bはUVと青錐体、Arr3aは緑と赤錐体へとそれぞれ排他的に発現する。また、錐体型オプシンキナーゼGRK7のオルソログについても、Grk7bはUV錐体、Grk7aはUV錐体以外の錐体タイプに発現する。このように、倍加したシグナリング遺伝子は、それぞれ異なった遺伝子発現の分割

ターンを示す。その中でも特に、遺伝子重複と発現の分割化は、ゼブラフィッシュ成魚の腹側に存在する緑錐体と赤錐体の特徴づける(図2B)。ゼブラフィッシュには4種類の錐体オプシンに加え、局所的な遺伝子倍加により4種類の緑オプシン(RH2-1, RH2-2, RH2-3, RH2-4)と2種類の赤錐体サブタイプ(LWS1, LWS2)が存在する(図1B)⁹⁾。RH2-4は、他のRH2オプシンに比べて最も長波長側へとシフトした吸収極大波長を示し(RH2-1: 467 nm, RH2-2: 476 nm, RH2-3: 488 nm, RH2-4: 505 nm)、ゼブラフィッシュ成魚網膜においては腹側に限局して発現する^{9, 64)}。同様に、LWS1はLWS2に比べ長波長側にシフトしており(LWS1: 558 nm, LWS2: 548 nm)、腹側に発現する。つまり、腹側には長波長シフトした緑錐体と赤錐体のサブタイプ(RH2-4とLWS1)がそれぞれ独立に存在し、これら2種類の錐体サブタイプは腹側網膜に照射される光の受容に特化したと考えられる。腹側の網膜には、太陽からの直接光である下り光が降り注ぎ(図2B)、下り光には長波長の光成分がより豊富に含まれる⁴²⁾。長波長シフトした緑と赤錐体サブタイプを腹側に備えることによって効率よく下り光を捉えていると示唆される。さらに下り光は、水底から水面へ向かう上昇光よりも100倍以上光強度が高い⁴²⁾。腹側の緑と赤錐体サブタイプにおいては、他の場所の錐体に比べて光シグナル活性化因子(Pde6cなど)の発現が減少しており、光シグナリングの過度な活性化によって引き起こされる細胞死が防がれていると考察できる。このように、ゼブラフィッシュ成魚腹側においては、全ゲノム重複を経た後の遺伝子発現の分割化により錐体サブタイプが特徴づけられている。

興味深いことに、さらなる全ゲノム重複(4R)が、キンギョ(*Carassius auratus*)とコイ(*Cyprinus carpio*)に共通する祖先(〜1400万年前)⁸⁾において生じている(図1B)。

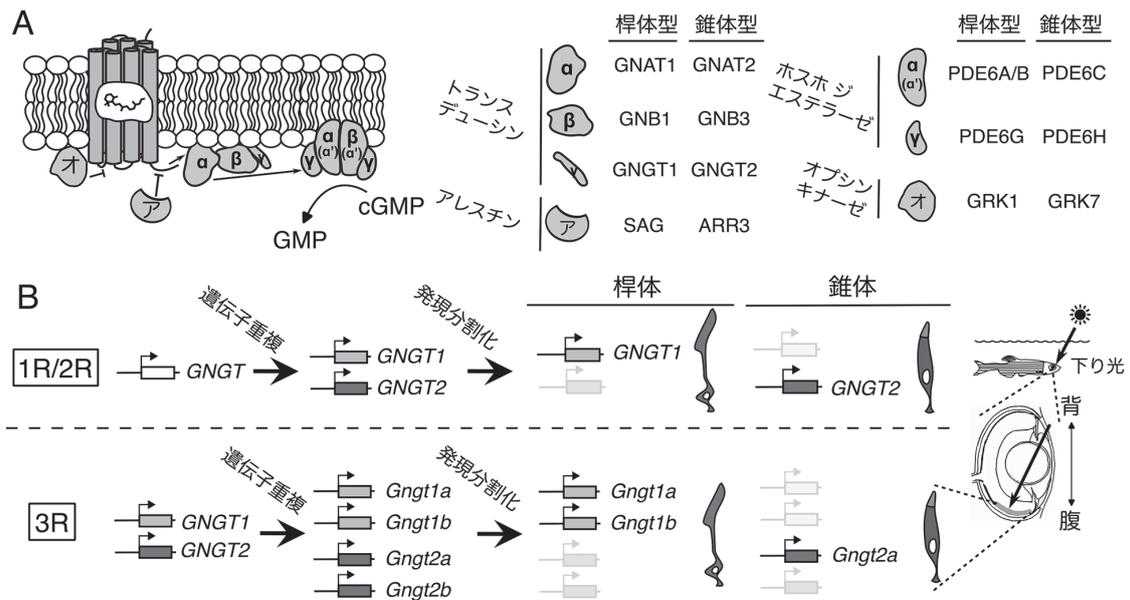


図2 光シグナル伝達コンポーネントの機能分化 (A) 光シグナル伝達カスケード。(B) 遺伝子重複と発現分割化による、トランスデューシンγサブユニット(GNGT)の機能分化。1R, 2R, 3Rはそれぞれ1, 2, 3度目の全ゲノム重複を意味する。

キンギョ網膜を用いたシングルセルトランスクリプトームが行われ、4Rによる遺伝子の倍加と遺伝子発現の分割化が報告された³⁴⁾。全ゲノム重複を経た後の遺伝子発現の分割化は、比較的短い進化時間にて達成可能であり、脊椎動物進化初期には桿体型と錐体型の遺伝子の機能分化が速やかに進んだと考えられる。

4. それぞれの生物における視細胞の適応

餌や捕食者など、生物の生存に必須な視覚情報の抽出は、自然光環境の下で行われる。多様な強度とスペクトルを持つ自然光の受容は、空間位置によって異なる光応答特性を示す視細胞を備えることにより可能となる。例えば昼行性の霊長類においては、網膜中央部のくぼみ状の場所に、錐体が密に存在する(中心窩と呼ばれる)。中心窩における錐体は、光反応の感度が高い¹⁴⁾。昼行性の霊長類であるカニクイザル(*Macaca fascicularis*)の中心窩に存在する錐体は、桿体型のトランスデューシグサブユニット(GNGT1)が発現している⁵⁴⁾。桿体型のトランスデューシグが錐体に発現することで、光シグナルの活性化時間を延ばし、光への感度を向上させていると考えられる。おそらく同様の目的で、ハツカネズミ(*Mus musculus*)の腹側に存在するUV錐体は桿体型のアレスチン(SAG)を発現し³⁾、これによって特に夕暮れや明け方の視野上方で捉えられる捕食者の認知感度を高めていると考えられる⁵⁶⁾。

ネズミと同様に、ゼブラフィッシュにおいても視野上方の視覚感度を高める機構が見られる。ゼブラフィッシュ幼生において、UV錐体が密に配置された*area temporalis* [strike zone (SZ)とも呼ばれる]が存在する⁷⁷⁾。SZに存在するUV錐体においては、光シグナル伝達を活性化する遺伝子群(Pde6cやGnat2など)の発現が増強され、逆に、抑制のフィードバックに関わる因子(Gngt2やPde6hなど)の発現は抑制されている。その結果、SZのUV錐体の光活性化時間が延長し、視覚感度が向上したと考えられている⁷⁴⁾。幼生はSZを含む腹側の網膜においてまず、餌となるゾウリムシを捕捉して摂餌行動を開始する。ゾウリムシはUV光をより強く反射するため、感度が高いUV錐体をSZに備えることで効率のよい摂餌が可能となる。また、前節で述べたように、成魚ゼブラフィッシュにおいては、全ゲノム重複を経た遺伝子発現の区画化により(Gngt2aとGngt2b)、長波長シフトした赤錐体サブタイプを腹側の網膜に備えることで、効率よく下り光を捉えている(図2B)。このように、脊椎動物の進化の過程において、進化初期に獲得された桿体型と錐体型の光シグナル伝達遺伝子の発現パターンは維持されている一方で、それぞれの生物においては、一部の光シグナル伝達コンポーネントの発現パターンを原則から逸脱させることにより、視細胞の光感度を高めている。

長い進化の過程においては、視細胞の種類にさらに劇的な変化が生じる⁵⁾。哺乳類の共通祖先においては、進化の過程で夜行性の期間が長くなったことで複数の錐体タイプ(SWS2とRH2)が失われた²⁶⁾(図1B)。哺乳類の共通祖先だけでなく、軟骨魚類(サメなど)やヘビ亜目など複数の系統において、SWS2とRH2錐体オプシンは進化の過程で独立に失われている^{6, 24, 28)}。さらに、進化の過程で桿体にも変化が生じた。両生類においては波長感受性の異なる2種類の桿体が存在し、1つは従来の中波長感受性の桿体(赤桿

体)であり、もう1つはロドプシンの代わりにSWS2錐体オプシンを発現する桿体(緑桿体)である¹⁷⁾。これら2種類の桿体を介することで、ヨーロッパアカガエル(*Rana temporaria*)は薄明条件下において色弁別ができる⁷⁵⁾。またヤモリ科の生物においては、桿体にさらなるパラダイムシフトが生じた。ヤモリの祖先是昼行性と夜行性という両極端な光習性を進化の過程で繰り返し獲得したことで、ロドプシンおよび複数の桿体型の光シグナル伝達コンポーネントを失った⁵⁵⁾。にもかかわらず、ヤモリ科の現生生物には形態学的に桿体に似た視細胞が備わり、オオヤモリ(*Gekko gecko*)においては、「桿体」は錐体オプシンSWS2を発現する^{28, 33)}。このように、脊椎動物進化の過程において視細胞の種類は増加することがあり、他の例では鳥類は4つの錐体タイプに加えて2種類の複錐体(Double cone principleとDouble cone accessory)を持つ⁶⁾。

以上のように、進化の過程において、視細胞タイプの数は増加や減少する。では、長い時間スケールにおいて、進化的に保存された相同な細胞タイプはいかにして見いだすことが可能だろうか?視細胞タイプの根源的なマーカーであるオプシン遺伝子すらも、その発現パターンのみでは視細胞タイプを同定できない(前節のカエルやイモリの例)。そこで、進化の過程において最も頑強なシステムであると考えられる、転写調節因子による細胞分化システムに着目する。転写因子による遺伝子制御は、ドメイン保存性が非常に高いDNA結合領域を介して行われ、多様な制御接続が織りなすネットワークは進化過程で大きな変化が生じにくい⁴⁷⁾。視細胞に備わる細胞分化ネットワークを生物横断的に比較することにより、それぞれの視細胞タイプの種を超えた相同性が解明される。

5. 脊椎動物の網膜の細胞分化

キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)やセンチュウ(*Caenorhabditis elegans*)などのモデル動物を用いた遺伝子スクリーニングにより、DNA結合ドメインを持つ転写調節因子が細胞の分化を制御することが明らかとなった。さらに、遺伝子工学と遺伝学を組み合わせた詳細な解析が行われ、複数の調節因子が転写制御ネットワークを形成し、組織や細胞タイプごとに特徴的な遺伝子発現を生み出すことが分かった。脊椎動物の網膜においても、動的な転写調節ネットワークにより、ロバスタな細胞分化が可能となる^{7, 76)}。網膜の発生過程においては、網膜前駆細胞が決まった割合で特定の網膜細胞へと分化し、その分化した細胞種類の割合は経時的に変化する。細胞分化に寄与する一部の調節因子は分化が完了した後も発現が持続し、細胞特異的な転写調節を行う。本総説では、視細胞の終末分化や維持に必須であり、かつ成熟した視細胞タイプに持続的に発現する因子に焦点を当て、3種類の脊椎動物(ゼブラフィッシュ、ハツカネズミ、ヒト)において視細胞分化ネットワークを比較し、その共通性と多様性を考察する(図3)。

ハツカネズミとゼブラフィッシュにおいて、ホメオボックス型の転写因子Cone-rod homeobox (CRX)は視細胞の成熟に必須の因子である^{21, 22, 59)}。ヒトにおいては、CRXは視細胞ジストロフィーなど様々な視細胞疾患の原因遺伝子であり^{21, 61)}、視細胞の成熟に必須の遺伝子である。さらに

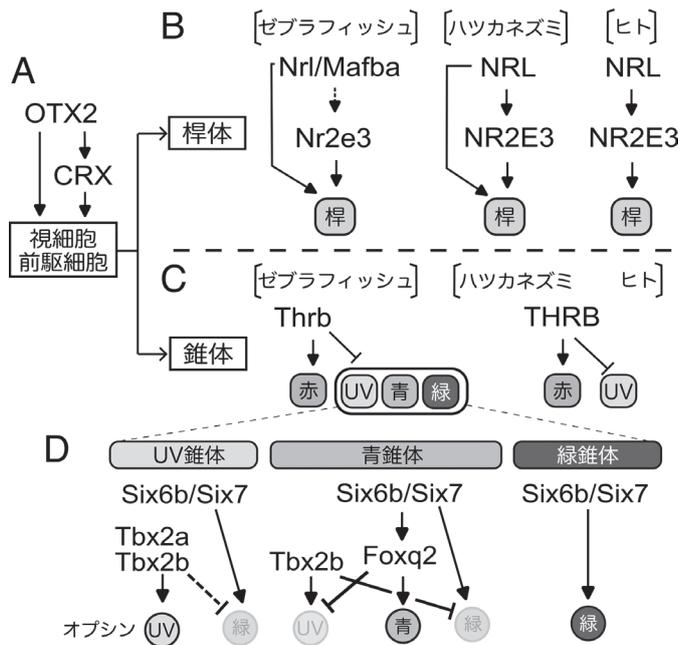


図3 転写調節因子による視細胞分化ネットワーク (A) 視細胞前駆細胞の分化ネットワーク。(B) 桿体の分化ネットワーク。(C) ゼブラフィッシュ, ハツカネズミ, ヒトにおける赤錐体タイプの細胞分化ネットワーク。(D) ゼブラフィッシュUV錐体, 青錐体, 緑錐体タイプそれぞれの細胞分化ネットワーク。ネットワークの構造から, 遺伝子制御が存在する可能性が示唆されているが, 実験において観察されていない制御接続を破線で示した。

は, 進化的に広く保存された遺伝子であり, かつCRXの上流遺伝子であるOrthodenticle homeobox (OTX2)も, 3種類全ての脊椎動物において視細胞の分化に必須である^{32, 68, 72}。進化的に広く保存されたOTX2-CRXネットワークにより前駆細胞は視細胞へと運命決定される(図3A)。

6. 桿体の分化制御ネットワーク

網膜色素変性症を引き起こす自然突然変異の研究により, Neural retina leucine zipper (NRL) とオーファン核内受容体 NR2E3が桿体分化に必須の遺伝子であることが明らかとなった^{12, 43}。NRLを機能阻害すると, 桿体はUV錐体タイプ(哺乳類ではS錐体と呼ばれる)へと運命転換する^{27, 43}。NR2E3はNRLの下流において錐体タイプの遺伝子発現を桿体において抑制し, 桿体の成熟に寄与する¹²。また, NR2E3は網膜変性疾患Enhanced S-cone syndrome (ESCS)の原因遺伝子である。ESCSは夜盲性疾患の一種であり, 患者のS錐体は青色光に対して高い感度かつ振幅の大きい応答を示す。

桿体分化制御は生物種間において異なる。鳥類など一部の分類群において, 桿体の分化と成熟に必須の遺伝子NRLはゲノムから失われており, NRLと同じMafファミリーに属す転写因子MAFAがニワトリ (*Gallus gallus*) の桿体分化メカニズムに寄与すると示唆されている³¹。また, ゼブラフィッシュにおいては, MafbaとNrlがともに桿体分化を制御する³⁹。さらに, ヒトとゼブラフィッシュにおいてNR2E3は桿体分化に必須であるが^{45, 71}, ハツカネズミにおいてはNR2E3を機能阻害しても桿体は正常に分化する¹²。まとめると, MAF/NRL—NR2E3ネットワークは桿体分化に必須であり, 真骨類と哺乳類に共通の祖先において獲得されたと考えられる。さらに脊椎動物のそれぞれの系譜において, MAF/NRL—NR2E3ネットワークが独自に改変されている(図3B)。

7. 赤錐体の分化制御ネットワーク

活性化型の甲状腺ホルモン triiodothyronine (T3) をラット網膜培養細胞へ投与すると, 錐体への分化が促進される³⁰。甲状腺ホルモン受容体型の転写因子の探索が行われた結果, Thyroid hormone receptor beta (THRβ)が, ヒトとハツカネズミにおいて赤錐体オプシン遺伝子発現に必須であることが分かった^{20, 46}(図3C)。THRβはDNA結合ドメインを介して遺伝子近傍に存在するシス調節領域に結合して, 活性化型サイロイド(T3)依存的に赤オプシンの転写を活性化する^{3, 53}。

ヒトやハツカネズミと同様に, ゼブラフィッシュ赤錐体においてもThrbは必須な遺伝子である^{62, 67}。Thrbを欠損すると赤錐体からUV錐体への細胞運命転換が生じ, 逆に, 視細胞前駆細胞にThrbを異所発現させると前駆細胞がすべて赤錐体へと運命転換する^{62, 67}。また, Thrbはゼブラフィッシュ赤錐体に選択的に発現している^{2, 48, 50}。したがって, Thrbは錐体タイプ決定における最上流因子であり, 他の錐体タイプの運命決定は, 赤錐体タイプの後に行われると考えられる(図3C)。

8. UV錐体の分化制御ネットワーク

赤オプシンと同様に, UVオプシンは脊椎動物種間において広く保存された遺伝子である。ハツカネズミの赤錐体分化におけるTHRβの役割が20年以上前に初めて報告された一方で, 哺乳類におけるUV錐体の決定因子はいまだに解明されていない。ゼブラフィッシュにおいては, 順遺伝学的探索によってT-box 2b (Tbx2b)がUV錐体分化の責任因子であることが判明した¹。Tbx2aとTbx2bはともにUV錐体分化に必須であり^{1, 2}, 複数の錐体タイプに発現して多面的な制御を担う(図3D)。Tbx2aはUV錐体と赤錐体に, Tbx2bはUV錐体と青錐体に発現する。Tbx2aとTbx2bは赤錐体と青錐体においてそれぞれ緑オプシン遺伝子の発現を抑制する^{1, 2}。さらに, Tbx2bは青オプシンの遺

伝子発現にも必要である⁵⁰)。Tbx2aやTbx2bが哺乳類UV錐体の運命決定を行うマスター因子であるかどうかは今後の研究が必要であるが、興味深いことに、Tbx2bのオルソログTBX2はカンクイサルやヒトのUV錐体に選択的に強く発現しており^{41, 54})、進化的に保存されたUV錐体の必須因子である可能性が強く示唆される。

哺乳類UV錐体の機能解析が遅れている理由として、ハツカネズミにおいてはほぼ全てのUV錐体において赤オプシンを共発現し、UVオプシンのみを発現する真のUV錐体が非常に少ないことが挙げられる。その一方で、ゼブラフィッシュ成魚の網膜においては、脊椎動物色覚の原型である4つの錐体タイプが1:1:2:2(UV:青:緑:赤)の割合で存在する⁵⁷)。さらには、ゼブラフィッシュは真骨類に特異的な3度目の全ゲノム重複(3R)を経験しており²³)、脊椎動物TBX2のオルソログはTbx2aとTbx2bへと機能分化した。この機能分化により、ハツカネズミで報告されるTBX2欠損に伴う胚性致死はゼブラフィッシュにおいては観察されず、発生後期のイベントである視細胞分化における転写因子の機能解析が可能になった。このように、比較的少数の錐体タイプから構成された哺乳類の視細胞分化ネットワークを理解する上で、魚類の知見は不可欠である。

9. 青錐体と緑錐体の分化制御ネットワーク

哺乳類においては失われた青オプシンや緑オプシンを発現する錐体タイプの分化を決定する複数の転写因子が、ゼブラフィッシュにおいて同定された(図3D)。Sine oculis homeobox 7 (Six7)はゼブラフィッシュ緑錐体の分化に必須である^{51, 60})。さらなる解析から、Six7のオルソログであるSix6bが、Six7変異体の表現型をレスキューすることが分かった⁴⁹)。緑錐体に加えてさらに、Six6bとSix7は協調して青錐体の分化を制御する⁴⁹)。Six6bとSix7はともに青と緑オプシンのプロモーターとエンハンサーに結合し、またSix6bとSix7が結合するゲノム領域には、CrxのDNA結合モチーフ(TAATCC)¹³)が高頻度で存在する⁴⁹)。したがってSix6bとSix7はCrxと協調的に、緑や青錐体オプシンを転写活性化すると考えられる。

Forkhead box Q2 (Foxq2)は青錐体の分化に必須である^{2, 50})。分化時期の視細胞にFoxq2を強制発現すると青錐体への分化が促進され、その一方で、UV錐体と緑錐体への分化は抑制される⁵⁰)。Six7機能欠損個体においてFoxq2を強制発現させると、青オプシン遺伝子の発現は上昇する一方で、Six7変異体において減少した緑オプシン遺伝子の発現はレスキューされないことから⁵⁰)、Six6bとSix7はFoxq2の上流因子であると考えられる(図3D)。Six6bとSix7が、Foxq2遺伝子周辺の制御領域に結合することも、Foxq2の上流因子であるという説を支持している⁴⁹)。

錐体タイプの分化制御に必須の因子であるTbx2b, Thrb, Foxq2が特定の錐体タイプに選択的に発現する一方で、青錐体と緑錐体両方の制御因子であるSix6bとSix7は、すべての錐体タイプに発現する。したがって、緑錐体に選択的に発現する別の転写因子(Pdbx1a, Cxhc4など)がSix6bとSix7の制御の下流において、緑錐体タイプの分化成熟を担う可能性が示唆される⁴⁸)。ただし、ゼブラフィッシュには4種類の緑オプシンが別々の緑錐体サブタイプに

発現し⁶⁴)、それらすべての緑錐体遺伝子と共発現する転写因子は確認されていない。そのため、緑錐体タイプだけに運命決定する制御因子がもしあるならば、複数存在すると考えられる。その一方で、緑錐体タイプにユニークな転写産物は他の錐体タイプに比べると非常に少ないことから⁴⁸)、緑錐体タイプの分化においては緑錐体タイプ独自の転写ネットワークが存在しないとも考えられる(図3D)。この仮説に従うと、緑錐体の細胞分化は、(I)全錐体タイプのマーカーであるSix6bとSix7が発現し、さらに(II)緑錐体タイプ以外の錐体の発生分化に必須の因子(Tbx2a/Tbx2b, Foxq2, Thrb)が発現しないことで達成されると考えることができる。言い換えると、錐体の転写ネットワークには階層性があり、緑錐体タイプは、他のいずれもの錐体タイプに運命決定されない場合に選択されるデフォルトの錐体タイプである可能性がある。この「緑デフォルト仮説」は、桿体のマスター因子であるNrlやNr2e3を欠損したゼブラフィッシュ成魚個体において緑オプシンが異所発現する^{39, 71})ことから支持される。同様に、UV錐体タイプの制御因子Tbx2aとTbx2bをそれぞれ欠損すると、赤錐体と青錐体にそれぞれ緑オプシン遺伝子が異所発現する^{2, 50})。このように、赤、緑、青、UVすべての錐体において緑オプシン遺伝子が(潜在的に)発現する機構があるが、緑錐体タイプ以外においてはその発現は抑制されていると考えられる(図3D)。

10. 錐体の分化制御ネットワークの進化的な変遷

視細胞のマスターレギュレーターOTX2とCRXや、赤錐体に必須の因子THRBが形成する制御ネットワークはゼブラフィッシュと哺乳類において共通である(図3)。したがって、約4.5億年前の真骨類と四肢動物の共通祖先の赤錐体タイプと、現生物の赤錐体タイプは相同な細胞であると帰結できる。さらに、ゼブラフィッシュ錐体タイプの分化に必須な転写因子(Tbx2a/b, Foxq2, Six6b, Thrb)は、硬骨魚類(真骨類と四肢動物をすべて含むグループ)において広く保存された遺伝子である。したがって、ゼブラフィッシュ4色型の錐体分化ネットワークは、硬骨魚類において広く保存されていると考えられる。特に、青オプシンSWS2をゲノムに保持する真骨類や鳥類や爬虫類においては、FOXQ2のオルソログ遺伝子もゲノムにコードされている。さらには、有胎盤類にもっとも近縁な単孔類のカモノハシ(*Ornithorhynchus anatinus*)においても、SWS2とFOXQ2遺伝子はともにゲノム中に存在する⁵⁰)。逆に、青オプシンを進化の過程で失った有胎盤類において、FOXQ2遺伝子は確認されていない。したがって、FOXQ2を介した青錐体分化制御は硬骨魚類に共通であり、またFOXQ2は青錐体タイプの分化に特化した機能を持つことが示唆される。ゼブラフィッシュFoxq2は、全組織のうち青錐体においてのみ遺伝子発現が観察されていることもFOXQ2の機能特化を支持する⁵⁰)。

緑オプシンは脊椎動物進化の過程で独立の系統群において繰り返し失われており、その喪失頻度はロドプシンや他の錐体オプシンよりも多い(図1B)。視細胞の分化ネットワークは入り組んでいるため、桿体や錐体タイプの分化ネットワークのうちいずれかを進化の過程で失うと、他の視細胞タイプにも影響すると想定される。その一方で、緑

デフォルトの分化制御ネットワークであれば(前節を参照), 緑錐体タイプの分化制御システムを進化の過程で喪失したとしても他の錐体に影響しないために, 緑オプシン遺伝子を容易に喪失しているのかもしれない(図1B)。哺乳類に至る系譜としては, 夜行性の生息環境にあった哺乳類の共通祖先種においてまず, 錐体タイプの分化制御システムを変えずに緑錐体オプシンを失い, 次に有胎盤類の共通祖先においてFOXQ2を介した青錐体の分化制御システムを失ったことにより, UV錐体タイプをデフォルトとする哺乳類型の視細胞分化ネットワーク⁶³⁾に移行したと考えられる。

11. 今後の展望

「Nothing in biology makes sense except in the light of evolution」¹⁶⁾——本総説では, 約4.5億年前の真骨類と四肢動物の共通祖先に備わっていたであろう視細胞分化制御ネットワークを考察した。ただし現時点では, およそ6万6千種の現存する脊椎動物のうち, たった3種類のネットワーク比較である。モデル生物だけではなく, 進化距離の離れた多様な生物を用いて種間比較を行ってこそ, 種を超えた細胞の相同性を解明できる。非モデル生物におけるオーミクス研究は近年爆発的に増加している。DNAシーケンシングやオーミクス技術の革新により, シングルセルレベルの分子プロファイルが比較的容易に取得でき, 発現プロファイルのみを用いた細胞タイプの同定が可能となった。しかしながら, インフォーマティクスを用いたクラスタリング結果の生物学的な意義を検証するためには, 形態学的, 生理学的な知見が必要である。これまで, 多様な動物を用いた比較が多岐にわたる研究分野(生化学, 細胞生物学など)で行われ, 比較生理生化学会の会員の方々も大いに貢献されてきた。これら膨大な生物比較の知見を用い, また今後も比較生理生化学会会員の方々のお力を拝借して, 種を超えた細胞の相同性に迫りたい。

謝 辞

本論文の執筆にあたり, Joseph C. Corbo 博士には進化の概念や転写調節メカニズムについて貴重なアドバイスをいただきました。また, 福富又三郎博士とRoberto Arbore 博士には論文の構成や言葉の定義についての確なご指摘をいただきました。阿部泰子博士には図の構成について具体的なご意見をいただき, また日本語を丁寧に添削していただきました。心より感謝申し上げます。編集委員会の佐倉緑博士には, 総説執筆の機会をご提供いただき, また編集作業を行なっていただきました。大変お世話になりました。

文 献

- 1) Alvarez-Delfin, K., Morris, A. C., Snelson, C. D., Gamse, J. T., Gupta, T., Marlow, F. L., Mullins, M. C., Burgess, H. A., Granato, M., & Fadool, J. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 106, 2023-8 (2009)
- 2) Angueyra, J. M., Kunze, V. P., Patak, L. K., Kim, H., Kindt, K., & Li, W.: eLife, 12, e81579 (2023)
- 3) Aramaki, M., Wu, X., Liu, H., Liu, Y., Cho, Y.-W., Song,

- M., Fu, Y., Ng, L., & Forrest, D.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 119, e2209884119 (2022)
- 4) Arendt, D., Musser, J. M., Baker, C. V. H. et al.: Nat. Rev. Genet., 17, 744-757 (2016)
- 5) Baden, T., Euler, T., & Berens, P.: Nat. Rev. Neurosci., 21, 5-20 (2020)
- 6) Bowmaker, J. K.: Vis. Res., 48, 2022-2041 (2008)
- 7) Brzezinski, J. A., & Reh, T. A.: Development, 142, 3263-3273 (2015)
- 8) Chen, Z., Omori, Y., Koren, S. et al.: Sci. Adv., 5, eaav0547 (2019)
- 9) Chinen, A., Hamaoka, T., Yamada, Y., & Kawamura, S.: Genetics, 163, 663-675 (2003)
- 10) Collin, S. P., Knight, M. A., Davies, W. L., Potter, I. C., Hunt, D. M., & Trezise, A. E. O.: Curr. Biol., 13, R864-R865 (2003)
- 11) Corbo, J. C.: Dev. Biol., 475, 145-155 (2021)
- 12) Corbo, J. C., & Cepko, C. L.: PLOS Genet., 1, e11 (2005)
- 13) Corbo, J. C., Lawrence, K. A., Karlstetter, M. et al.: Genome Res., 20, 1512-1525 (2010)
- 14) Curcio, C. A., Sloan, K. R., Kalina, R. E., & Hendrickson, A. E.: J. Comp. Neurol., 292, 497-523 (1990)
- 15) Darwin, C.: On the origin of species by means of natural selection, or, The preservation of favoured races in the struggle for life. London: John Murray (1859)
- 16) Dobzhansky, T.: Am. Biol. Teach., 35, 125-129 (1973)
- 17) Donner, K., & Yovanovich, C. A. M.: Semin. Cell Dev. Biol., 106, 72-85 (2020)
- 18) Ebrey, T., & Koutalos, Y.: Prog. Retin. Eye Res., 20, 49-94 (2001)
- 19) Eilertsen, M., Davies, W. I. L., Patel, D., Barnes, J. E., Karlsen, R., Mountford, J. K., Stenkamp, D. L., Patel, J. S., & Helvik, J. V.: Front. Neuroanat., 16, 945344 (2022)
- 20) Eldred, K. C., Hadyniak, S. E., Hussey, K. A. et al.: Science, 362, eaau6348 (2018)
- 21) Freund, C. L., Gregory-Evans, C. Y., Furukawa, T. et al.: Cell, 91, 543-553 (1997)
- 22) Furukawa, T., Morrow, E. M., & Cepko, C. L.: Cell, 91, 531-541 (1997)
- 23) Glasauer, S. M. K., & Neuhauss, S. C. F.: Mol. Genet. Genom., 289, 1045-1060 (2014)
- 24) Hara, Y., Yamaguchi, K., Onimaru, K. et al.: Nat. Ecol. Evol., 2, 1761-1771 (2018)
- 25) Hisatomi, O., & Tokunaga, F.: Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol., 133, 509-522 (2002)
- 26) Jacobs, G. H.: Philos. Trans. R. Soc. B, 364, 2957-2967 (2009)
- 27) Kallman, A., Capowski, E. E., Wang, J. et al.: Commun. Biol., 3, 82 (2020)
- 28) Katti, C., Stacey-Solis, M., Coronel-Rojas, N. A., & Davies, W. I. L.: Front. Ecol. Evol., 7, 352 (2019)
- 29) Kawamura, S., & Tachibanaki, S.: Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol., 150, 369-377 (2008)
- 30) Kelley, M. W., Turner, J. K., & Reh, T. A.: Development, 121, 3777-3785 (1995)
- 31) Kim, J.-W., Yang, H.-J., Oel, A. P., Brooks, M. J., Jia, L.,

- Plachetzki, D. C., Li, W., Allison, W. T., & Swaroop, A.: *Dev. Cell*, 37, 520-532 (2016)
- 32) Koike, C., Nishida, A., Ueno, S. et al.: *Mol. Cell Biol.*, 27, 8318-8329 (2007)
- 33) Kojima, D., Okano, T., Fukada, Y., Shichida, Y., Yoshizawa, T., & Ebrey, T. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 6841-6845 (1992)
- 34) Kon, T., Fukuta, K., Chen, Z. et al.: *Commun. Biol.*, 5, 1404 (2022)
- 35) Lamb, T. D.: *Prog. Retin. Eye Res.*, 76, 100823 (2020)
- 36) Lamb, T. D.: *J. Physiol.*, 600, 4585-4601 (2022)
- 37) Levine, M.: *Curr. Biol.*, 20, R754-R763 (2010)
- 38) Leys, S., & Hejnol, A.: *Origin and Evolution of Metazoan Cell Types*. CRC Press (2021)
- 39) Liu, F., Qin, Y., Huang, Y. et al.: *PLOS Genet.*, 18, e1009841 (2022)
- 40) Long, H. K., Prescott, S. L., & Wysocka, J.: *Cell*, 167, 1170-1187 (2016)
- 41) Lukowski, S. W., Lo, C. Y., Sharov, A. A. et al.: *EMBO J.*, 38, e100811 (2019)
- 42) McFarland, W. N., & Munz, F. W.: *Vis. Res.*, 15, 1063-1070 (1975)
- 43) Mears, A. J., Kondo, M., Swain, P. K., Takada, Y., Bush, R. A., Saunders, T. L., Sieving, P. A., & Swaroop, A.: *Nat. Genet.*, 29, 447-452 (2001)
- 44) Morshedian, A., & Fain, G. L.: *Curr. Biol.*, 25, 484-487 (2015)
- 45) Mullin, N. K., Bohrer, L. R., Voigt, A. P., Wright, A., Lozano, L. P., Mullins, R. F., Stone, E. M., & Tucker, B. A.: *bioRxiv*, 2023.06.30.547279 (2023)
- 46) Ng, L., Hurley, J. B., Dierks, B., Srinivas, M., Saltó, C., Vennström, B., Reh, T. A., & Forrest, D.: *Nat. Genet.*, 27, 94-98 (2001)
- 47) Nitta, K. R., Jolma, A., Yin, Y. et al.: *eLife*, 4, e04837 (2015)
- 48) Ogawa, Y., & Corbo, J. C.: *Sci. Rep.*, 11, 17340 (2021)
- 49) Ogawa, Y., Shiraki, T., Asano, Y., Muto, A., Kawakami, K., Suzuki, Y., Kojima, D., & Fukada, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 116, 4651-4660 (2019)
- 50) Ogawa, Y., Shiraki, T., Fukada, Y., & Kojima, D.: *Sci. Adv.*, 7, eabi9784 (2021)
- 51) Ogawa, Y., Shiraki, T., Kojima, D., & Fukada, Y.: *Proc. R. Soc. B: Biol.*, 282, 20150659 (2015)
- 52) Okano, T., Kojima, D., Fukada, Y., Shichida, Y., & Yoshizawa, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 5932-5936 (1992)
- 53) Onishi, A., Peng, G.-H., Chen, S., & Blackshaw, S.: *Nat. Neurosci.*, 13, 1059-1065 (2010)
- 54) Peng, Y.-R., Shekhar, K., Yan, W., Herrmann, D., Sappington, A., Bryman, G. S., Zyl, T. van, Do, M. Tri, H., Regev, A., & Sanes, J. R.: *Cell*, 176, 1222-1237.e22 (2019)
- 55) Pinto, B. J., Nielsen, S. V., & Gamble, T.: *Mol. Phylogenet. Evol.*, 141, 106639 (2019)
- 56) Qiu, Y., Zhao, Z., Klindt, D., Kautzky, M., Szatko, K. P., Schaeffel, F., Rifai, K., Franke, K., Busse, L., & Euler, T.: *Curr. Biol.*, 31, 3233-3247.e6 (2021)
- 57) Raymond, P. A., Colvin, S. M., Jabeen, Z., Nagashima, M., Barthel, L. K., Hadidjojo, J., Popova, L., Pejaver, V. R., & Lubensky, D. K.: *PLOS One*, 9, e85325 (2014)
- 58) Sakurai, K.: *Zool. Sci.*, 34, 326-330 (2017)
- 59) Shen, Y., & Raymond, P. A.: *Dev. Biol.*, 269, 237-251 (2004)
- 60) Sotolongo-Lopez, M., Alvarez-Delfin, K., Saade, C. J., Vera, D. L., & Fadool, J. M.: *PLOS Genet.*, 12, e1005968 (2016)
- 61) Sun, C., & Chen, S.: *Front. Mol. Neurosci.*, 16, 1134839 (2023)
- 62) Suzuki, S. C., Bleckert, A., Williams, P. R., Takechi, M., Kawamura, S., & Wong, R. O. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 15109-15114 (2013)
- 63) Swaroop, A., Kim, D., & Forrest, D.: *Nat. Rev. Neurosci.*, 11, 563-576 (2010)
- 64) Takechi, M., & Kawamura, S.: *J. Exp. Biol.*, 208, 1337-1345 (2005)
- 65) Tanay, A., & Sebé-Pedrós, A.: *Trends Genet.*, 37, 919-932 (2021)
- 66) Terakita, A.: *Genome Biol.*, 6, 213 (2005)
- 67) Volkov, L. I., Kim-Han, J. S., Saunders, L. M., Poria, D., Hughes, A. E. O., Kefalov, V. J., Parichy, D. M., & Corbo, J. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 117, 15262-15269 (2020)
- 68) Wahle, P., Brancati, G., Harmel, C. et al.: *Nat. Biotechnol.*, 1-11 (2023)
- 69) Walls, G. L.: *The vertebrate eye and its adaptive radiation*. Bloomfield Hills, MI: The Cranbrook Institute of Science (1942)
- 70) Warrington, R. E., Davies, W. I. L., Hemmi, J. M., Hart, N. S., Potter, I. C., Collin, S. P., & Hunt, D. M.: *J. Comp. Neurol.*, 529, 2265-2282 (2020)
- 71) Xie, S., Han, S., Qu, Z. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1865, 1273-1283 (2019)
- 72) Xu, B., Tang, X., Jin, M., Zhang, H., Du, L., Yu, S., & He, J.: *Development*, 147, dev185660 (2020)
- 73) Yokoyama, S.: *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.*, 9, 259-282 (2008)
- 74) Yoshimatsu, T., Schröder, C., Nevala, N. E., Berens, P., & Baden, T.: *Neuron*, 107, 320-337.e6 (2020)
- 75) Yovanovich, C. A. M., Koskela, S. M., Nevala, N., Kondrashev, S. L., Kelber, A., & Donner, K.: *Philos. Trans. R. Soc. B*, 372, 20160066 (2017)
- 76) Zhang, X., Leavey, P., Appel, H., Makrides, N., & Blackshaw, S.: *Trends Genet.*, 39, 736-757 (2023)
- 77) Zimmermann, M. J. Y., Nevala, N. E., Yoshimatsu, T., Osorio, D., Nilsson, D.-E., Berens, P., & Baden, T.: *Curr. Biol.*, 28, 2018-2032.e5 (2018)

Abstract

Photoreceptor differentiation mechanisms underlying cell-type homology among vertebrates

Yohey OGAWA

Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine

More than 500 million years ago, the common ancestor of vertebrates acquired daylight vision with four types of cone cells and dim light vision with rod cells. Each photoreceptor cell has its unique phototransduction system and exhibits a characteristic cell morphology. These features are highly conserved across species, making it possible to identify photoreceptor cells in the retina in each species despite large evolutionary distances. However, photoreceptor cells in each species have been uniquely adapted to their specific light environment, and the number of photoreceptor cell types can vary greatly. This article explores the molecular basis of cross-species cell-type homology comparing the transcriptional mechanisms of photoreceptor differentiation in three species: zebrafish, house mouse, and human. Finally, I addressed the evolutionary shift from the four-cone type photoreceptor differentiation network, which would have been maintained in the common ancestor of fish and mammals, to the two-cone type mammalian network.

Keywords: photoreceptor, opsin, transcription factor, evolution, retinal development, color vision, cone