

脊椎動物における色覚の分子塩基（全文日本語訳＋図表付き）

翻訳元：Genes Genet. Syst. (1999) 74, 189–199, Shozo Yokoyama 「Molecular bases of color vision in vertebrates」

Genes Genet. Syst. (1999) 74, 189–199

脊椎動物の色覚

福岡国際集団遺伝学シンポジウム 講演録

脊椎動物における色覚の分子塩基

Shozo Yokoyama

シラキュース大学 生物学部 生物学研究所 (Biological Research Laboratories, Department of Biology, Syracuse University, 130 College Place, Syracuse, NY 13244)

(受理：1999 年 11 月 8 日)

要旨

視覚色素は視覚の開始に関わり、その最大吸収波長 ($\lambda_{\max}$) によって特徴づけられる。視覚色素の $\lambda_{\max}$ 値の改変により、生物は多様な光環境へ適応してきた。培養細胞を用いた視覚色素の機能アッセイが可能になったことで、視覚は適応と色覚の遺伝学を探索上で理想的な遺伝学的モデル系となった。脊椎動物の網膜に存在する視覚色素は、進化的に区別される 5 群、すなわち RH1 ($\lambda_{\max} = 490\text{--}500\text{ nm}$)、RH2 (470–510 nm)、SWS1 (360–420 nm)、SWS2 (440–455 nm)、LWS/MWS (510–570 nm) に分類される。本稿では、これらの視覚色素における $\lambda_{\max}$ の移動 (シフト) と関連づけられてきたアミノ酸置換について概説する。

複数の RH1 色素で観察される $\lambda_{\max}$ の青方偏移は、生息環境の青色光への適応を反映していると考えられ、主として 83 位 D→N (D83N)、122 位 E→Q (E122Q)、292 位 A→S (A292S) で説明できる。同様に、RH2 色素の青方偏移は D83N、E122Q、164 位 A→S (A164S)、207 位 M→L (M207L) で説明できる。鳥類の SWS1 色素では、84 位 S→C (S84C) という 1 箇所の置換だけで紫外 (UV) 感受性型が紫型から転換したとみられる。LWS/MWS 色素については、180、197、277、285、308 番目のアミノ酸の加算的効果が、多様な脊椎動物における赤—緑色覚を完全に説明する。これらの観察は、現存する視覚色素の進化が、ごく少数の部位でのアミノ酸置換によって説明できることを示している。

視覚色素は G タンパク質共役受容体 (GPCR) の一群であり、視覚興奮を開始する (Wald 1968)。各視覚色素は膜貫通蛋白質であるオプシンと発色団 11-シスレチナー

ルからなり、最大吸収波長 ($\lambda_{\max}$) で特徴づけられる。ヒトの色覚は「青」「緑」「赤」の 3 種類の錐体視覚色素によって媒介される。「青」色素は約 370–570 nm を吸収し $\lambda_{\max}$ は 420 nm、「緑」と「赤」色素は約 450–620 nm に感度を持ち、それぞれ $\lambda_{\max}$ は 530 nm と 560 nm である (Nathans 1989)。こうした色素の分光調節 (スペクトル・チューニング) の分子塩基はなお十分には解明されていないが、近年、重要な進展が得られている。

機能機構の評価に向けて、ウシ桿体特異的視覚色素 (ロドプシン) に多数のアミノ酸置換が導入されてきた (Yokoyama 1997)。多くの解析では荷電アミノ酸に注目している。たとえば 113 位のグルタミン酸 (E113) をグルタミン (E113Q) に置換すると、 $\lambda_{\max}$ は 500 nm から 380 nm へ大きく短波長側に移動する (Sakmar et al. 1989; Zhukovsky and Oprian 1989; Nathans 1990a, b)。E113 は正に荷電したプロトン化シッフ塩基に対する陰性の対イオンであり、この構造の改変が $\lambda_{\max}$ の大きな変化を引き起こす。しかし、E113Q を含む多くの置換は自然界では見つかっていないため、これらの変異原性実験が自然界の視覚色素における $\lambda_{\max}$ の多様化の説明にどれほど有用かは直ちには明らかでない (Yokoyama 1995, 1997)。

幸いにも、分子進化学的アプローチはこの問題を軽減できる (Yokoyama and Yokoyama 1990; Yokoyama 1995, 1997; Yokoyama et al. 1999)。視覚色素の配列データを解析することで、 $\lambda_{\max}$ を変化させうる重要候補のアミノ酸置換を同定できる。重要なのは、こうして得られた仮説が変異導入実験によって厳密に検証できる点である。視覚色素が多様な光環境へ機能適応してきた過程を研究することで、分子レベルでの自然選択の解明にも資する。本稿では、暗所視、紫外視、赤—緑色覚を例に、そうした解析を概観する。

背景情報

視覚色素の系統関係 脊椎動物網膜の視覚色素は大きく 5 群に分類される。①RH1 クラス (多くは桿体特異的、 $\lambda_{\max} \approx 500$ nm)、②RH2 クラス ($\lambda_{\max}$ 470–510 nm)、③SWS1 クラス (短波長感受性、 $\lambda_{\max}$ 360–420 nm)、④SWS2 クラス ($\lambda_{\max}$ 440–455 nm)、⑤LWS/MWS クラス (長波長・中波長感受性、 $\lambda_{\max}$ 510–570 nm) である

(Yokoyama 1994, 1995, 1997; Yokoyama and Yokoyama 1996; Okano et al. 1992; Hisatomi et al. 1994)。これらの系統関係は概ね「(((RH1, RH2) SWS2) SWS1) LWS/MWS)」で表される。5 群それぞれに広範な脊椎動物の色素が含まれるため、脊椎動物の共通祖先は 5 種類すべての視覚色素を有していたはずである (Yokoyama and Yokoyama 1996)。

視覚色素の分光調節を理解する進化学的アプローチ 分子機構の解明は次の 4 段階で進められる。(1) オプシン遺伝子のクローニングと分子解析。(2) 視覚色素の $\lambda_{\max}$ の測定。(3) 系統樹に沿って $\lambda_{\max}$ の変化と関連づけられる重要候補アミノ酸置換の同定。(4) 候補置換の実際の効果の決定。第 3 段階では、視覚色素の系統樹を構築し、進化系統上でのアミノ酸置換と $\lambda_{\max}$ のシフトを推定する。特定の置換と $\lambda_{\max}$ の変化を対応付ける際には、機能的重要性を示唆する高保存部位に主として着目する (Yokoyama 1994,

1995)。第2・第4段階の機能アッセイでは、培養細胞でオプシンを発現させ、11-シスレチナールを再構成し、抗体で精製して、再生した視覚色素の $\lambda_{\max}$ を決定する(Yokoyama 2000a)。

変異導入（ミュータジェネシス）の知見

これまでに、ウシロドプシンなど130残基以上で単独または複合のアミノ酸置換が導入された([図1])。そのうち、自然集団で確認された多型に基づく変異は少数で、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)の視覚色素に実装されている。これらの実験から、 $\lambda_{\max}$ を5 nm以上変化させる置換は10部位に限られることが示された([図1])。10部位のうち9つは膜貫通領域に位置し、発色団は膜貫通領域に埋め込まれてオプシンと相互作用するため妥当である(Hargrave et al. 1983; Baldwin 1993, 1994; Schertler et al. 1993; Unger and Schertler 1995)。残る1部位(H197Y)は膜貫通領域外にあるが、塩化物結合部位の消失によりヒト赤色素で28 nmの青方偏移を生じる(Sun et al. 1997)。

同一（または逆）方向の置換でも、 $\lambda_{\max}$ シフトの大きさは、色素の背景アミノ酸組成により大きく異なりうる。例えば[図1]の10番の変異(A $\leftrightarrow$ S)は、置換方向や用いた色素の種類によって8~28 nmの幅で異なる。

RH1 色素 現在、 $\lambda_{\max}$ 既知のRH1色素は30種に達する([表1])。RH1色素の系統樹([図2])から、83位D $\rightarrow$ N、122位E $\rightarrow$ Q、292位A $\rightarrow$ Sの3つが重要候補として各枝で同定される。ウシロドプシンでは各変異がそれぞれ6 nm(変異1)、19 nm(変異2)、10 nm(変異10)の青方偏移をもたらす([図1])。これら3残基はいずれも膜貫通領域に位置する([図3])。多くのRH1色素の $\lambda_{\max}$ は約500 nmだが、アナゴ、ウミウナギ、キンギョ、マトウダイ、シーラカンス、カメレオン、イルカでは $\lambda_{\max}$ が10-20 nm短波長側にずれている。ヤツメウナギ類を除けば、これらの青方偏移は3変異と強く共起し、上記置換が青方偏移を引き起こした可能性が高い。ヤツメウナギではD83Nの効果が他の置換で相殺されたのかもしれない。

アナゴ、ウミウナギ、マトウダイ、シーラカンス、イルカは青色光優勢の水界に棲み、青方偏移は光環境への適応の結果と考えられる。カメレオンでは発色団が11-シスレチナールではなく11-シス-3,4-デヒドロレチナールであるため(Provencio et al. 1992)、長波長側にシフトする傾向があり(Whitmore and Bowmaker 1989; Harosi 1994)、およそ500 nmに合わせ込むために青方偏移した可能性がある。キンギョの青方偏移の理由は明確ではない。

3つの候補置換のうち2つ(E122Q, A292S)の実効果はシーラカンス色素で検証され、単独変異Q122EとS292A、二重変異Q122E/S292Aにより、それぞれ $\lambda_{\max}$ 495、493、511 nmが得られ、E122QとA292Sが合わせて25 nmの青方偏移を生じ、観察される青方偏移を完全に説明した(Yokoyama et al. 1999)。

RH2 色素 RH2 は RH1 に最も近縁で、83 位 D→N、122 位 E→Q、207 位 M→L、164 位 A→S の 4 置換が $\lambda_{\max}$ シフトに関与する ([図 4])。D83N と E122Q は青方偏移をもたらすことが知られ、A164S はウシロドプシンとヒト MWS で 2 nm の赤方偏移をもたらす。M207L はシーラカンス RH2 の青方偏移の原因である。これら 4 部位はいずれも発色団近傍に位置する ([図 3])。

系統解析では、四肢動物祖先の RH2 で E122Q がまず起こり、その後、シーラカンスで M207L、カメレオンで A164S、ヤモリで D83N が独立に起こったと推定される。シーラカンス RH2 で Q122E と L207M の単独・二重変異を導入すると、 $\lambda_{\max}$ は 491、484、499 nm となり、2 置換で観測された青方偏移が完全に説明できた (Yokoyama et al. 1999)。なお、E122Q は RH1 と RH2 で独立に生じ、その効果はシーラカンス RH1 で 10 nm、RH2 で 13 nm とやや異なる ([図 1])。このことから、RH2 祖先の $\lambda_{\max}$ は大きく青方偏移していた可能性が高く、鳥類 RH2 ではそこから再び赤側へ戻ったことになる。この点の妥当性と機構の解明は今後の課題である。

鳥類の UV 色素 (SWS1) SWS1 の $\lambda_{\max}$ は 360 nm (UV) から 420 nm (紫) まで分布する。鳥類は UV 型と紫型のいずれかを持ち、UV 視の分子塩基の研究に適した系である。現在、キンカチョウ、カナリア、セキセイインコは UV 感受性、ハトとニワトリは紫感受性である ([表 1])。配列比較から、UV 感受性の 3 種に共通する C84 と I85 (キンカチョウ番号付け) が、他の多くの SWS1 (ニワトリ・ハトを含む) では S と V であることが分かった。すなわち鳥類では C84 と I85 が UV 感受性と高く相関する。キンカチョウ SWS1 に C84S 単独、あるいは C84S/V85I の二重変異を導入すると、 $\lambda_{\max}$ はそれぞれ 397 nm と 401 nm となり、紫感受性化した (未発表)。このことは、単独の C84S で UV 色素を紫色素へ変換できることを示す。多くの SWS1 が S84 と I85 を持つことから、S84C と I85V は紫型祖先から起こり、鳥類の UV 色素は紫色素から進化したと推測される。ただしセキセイインコの系統位置が不明瞭のため、S84C と V85I が 3 種の共通祖先で 1 回起こったのか、キンカチョウ/カナリア系統とセキセイインコ系統で独立に 2 回起こったのかは決められない ([図 5])。84 位は第 2 膜貫通部位にあり、発色団に非常に近い。なお、魚類 (キンギョ) やカメレオン、マウス、ラットなどの他の脊椎動物の UV 色素では、対応部位が S と V であるため、鳥類と他群の UV 視は、まったく異なる分子機構で独立に獲得されたと考えられる。

赤—緑色覚 (LWS/MWS) 人とメキシコ洞窟魚の LWS と MWS 配列比較から、両者の LWS/MWS は独立の遺伝子重複と塩基置換で生じたと結論づけられた。また、両種で LWS は MWS から、同一の 3 置換 A180S、F277Y、A285T (ヒト番号) により独立に進化したと推測された (Yokoyama and Yokoyama 1990; Neitz et al. 1991)。ウシロドプシンの対応置換 (A164S、F261Y、A269T) はそれぞれ 2、10、14 nm の $\lambda_{\max}$ 赤方偏移を引き起こし、LWS/MWS 差の大部分を説明する (Chan et al. 1992)。ヒトの MWS/LWS での変異導入でも本質的に同じ結論が得られたが、全体の約 30 nm の差を説明するには、さらに 4 残基の小さな寄与が必要である (Asenjo et al. 1994)。この「3 部位規則」

は多くの LWS/MWS に適用できるが、例外も見つかっている。すなわち、マウス、ラット、ウサギの正同質色素は A180, Y277, T285 を有するにも関わらず、 $\lambda_{\max}$ は約 510 nm である (Sun et al. 1997; Radlwimmer and Yokoyama 1998)。この極端な青方偏移は H197Y と A308S の 2 置換によることが判明した (Sun et al. 1997; Radlwimmer and Yokoyama 1998)。したがって赤—緑色覚は、180、197、277、285、308 の 5 部位で説明できる ([図 6])。197 位は膜貫通外だが、塩化物結合に重要である (Sun et al. 1997)。

この「5 部位規則」を検証するため、ネコ、ウマ、リス、シカ、モルモット、キンギョの LWS/MWS cDNA を同定し (Yokoyama and Radlwimmer 1999)、他の哺乳類とあわせて再生した視覚色素の $\lambda_{\max}$ を測定した ([表 1])。5 部位のアミノ酸と $\lambda_{\max}$ の関係を重回帰で評価すると、S180A、H197Y、Y277F、T285A、A308S はそれぞれ 7、28、7、15、16 nm の青方偏移 (逆方向では同じ幅の赤方偏移) を加算的にもたらし、これで哺乳類および他の脊椎動物 (キンギョ、カメレオン、ハト) における赤—緑色覚が完全に説明できた ([表 2])。ほぼすべての既知 LWS/MWS の分光感度は 5 部位規則と整合的である。

5 部位規則に基づき、哺乳類祖先の赤—緑色覚の進化も推定できる。祖先色素は S180, Y197, Y277, T285, A308 を持ち、 $\lambda_{\max}$ 531 nm の緑感受性だったと推定される ([図 7])。最初の赤色感受性はヒト、ウサギ、ネコ、ウマ、イルカ、ヤギ、シカの共通祖先 ($\lambda_{\max}=553$ nm) で生じ、ヒト LWS はここから A180S で現在の $\lambda_{\max}$ へと進化した。ヒト LWS の 62% は S180, H197, Y277, T285, A308 (典型的ヒト LWS) だが、38% は A180 を持ち $\lambda_{\max}=552$ nm で祖先型である (Winderickx et al. 1992; [表 1])。一方、ヒト MWS は Y277F と T285A により機能を戻し、現行の緑感受性を獲得した。追加された哺乳類データにより、ヒト MWS は祖先の LWS から派生したことが示唆され、当初の解釈 (MWS から LWS) を修正した (Yokoyama and Yokoyama 1990)。シカとイルカの緑感受性は、それぞれ Y277F/T285A と A308S で祖先 LWS から独立に派生した。ウサギ、モルモット、マウス、ラットでは $\lambda_{\max}$ が約 510 nm と著しく青方偏移しており、モルモットでは T285A のみ、ウサギでは H197Y と A308S、マウスとラットでは S180A と A308S で説明できる ([図 7])。以上より、現存の赤—緑色覚は、少数部位での独立な置換の組み合わせで繰り返し実現してきたと強く示唆される。

結論

Nathans らによりヒトの RH1、SWS1、LWS/MWS オプシン遺伝子がクローニングされ (Nathans and Hogness 1984; Nathans et al. 1986)、この cDNA 群を足がかりに多様な種のオプシン遺伝子が同定・解析された。比較配列解析は、視覚色素の $\lambda_{\max}$ シフトに関与しうる重要候補置換の同定に力を発揮している。こうして同定された置換に基づく部位特異的変異導入実験により、魚類の暗所視 (Yokoyama et al. 1995, 1999) や哺乳類の赤—緑色覚 (Chan et al. 1992; Asenjo et al. 1994; Sun et al. 1997) の遺伝的基盤が解明されてきた。

今後さらに多くの種でのオプシン遺伝子の分子解析が、視覚色素機能に重要な置換の特定を促進するだろう。比較配列に基づくミュータジェネシス解析は進化学的問題に取り組む一般的手法となり、分子進化学が実験設計において従来以上に実践的な役割を果たすと期待される (Yokoyama 1995, 1997; Yokoyama and Yokoyama 1996)。同時に、これらの実験は、様々な光環境への適応進化の分子塩基の理解に不可欠となる。

謝辞 Ruth Yokoyama の助言に感謝する。本研究は NIH (GM-42379) の助成により実施した。

表・図

[表 1] 脊椎動物の視覚色素のアミノ酸配列ソースと $\lambda_{\max}$ の一覧（本文参照）。

192

S. YOKOYAMA

Table 1. The source of the amino acid sequences and $\lambda_{\max}$ values of visual pigments in vertebrates

Group	Pigments	GenBank	Reference for $\lambda_{\max}$ values
RH1	Marine lamprey (P500)	U67123	Harosi and Kleinschmidt (1993)
	River lamprey (P500)	M63632	Hisatomi et al. (1991)
	Skate (P500)	U81514	Cornwall et al. (1989)
	River eel (P502)	L78007	Hope et al. (1997)
	Marine eel (P482)	L78008	Hope et al. (1997)
	Conger eel (P487)	S82619	Archer and Hirano (1996)
	Cavefish (P503)	U12328	Yokoyama et al. (1995)
	Goldfish (P492)	L11863	Johnson et al. (1993)
	Carp (P499)	S74449	Crescitelli and Dartnall (1954)
	John Dory (P492)	Y14484	Dartnall and Lythgoe (1965)
	Sandgoby (P501)	X62405	Archer et al. (1992)
	Guppy (P500)	Y11147	Schwanzara (1967)
	Mosquito fish (P505)	Y11146	Archer and Hirano (1997)
	Coelacanth (P495)	AF131253	Yokoyama et al. (1999)
	Leopard frog (P502)	S49004	Pittler et al. (1992)
	Bullfrog (P500)	S79840	Kayada et al. (1995)
	Clawed frog (P502)	L07770	Butni et al. (1996)
	Salamander (P506)	U36574	Chen et al. (1996)
	Alligator (P499)	U23802	Wald et al. (1957)
	Chameleon (P491)	L31503	Kawamura and Yokoyama (1998)
	Chicken (P503)	D00702	Okano et al. (1992)
	Pigeon (P502)	AF149230	Kawamura et al. (1999)
	Mouse (P498)	M55171	Bridges (1959)
	Rat (P498)	Z46957	Bridges (1959)
	Dog (P508)	X71380	Jacobs (1993)
	Bovine (P500)	M21606	Oprian et al. (1987)
	Dolphin (P488)	AF055456	Faick et al. (1998)
	Rabbit (P502)	U21688	Bridges (1959)
	Macaque (P500)	S76579	Bowmaker et al. (1980)
	Human (P497)	U49742	Crescitelli and Dartnall (1953)
RH2	Goldfish (P511)	L11865	Johnson et al. (1993)
	Goldfish (P506)	L11866	Johnson et al. (1993)
	Coelacanth (P478)	AF131258	Yokoyama et al. (1999)
	Chicken (P508)	M92038	Okano et al. (1992)
	Pigeon (P503)	AF149232	Kawamura et al. (1999)
	Chameleon (P495)	AF134189	Kawamura and Yokoyama (1998)
SWS1	Gecko (P467)	M92035	Kojima et al. (1992)
	Zebra finch (358)	-	Yokoyama et al. (unpublished data)
	Canary (P366)	-	Das et al. (1999)
	Parakeet (P371)	Y11787	Wilkie et al. (1998)
	Pigeon (P393)	AF149234	Yokoyama et al. (1998)
	Chicken (P415)	M92039	Okano et al. (1989)
LWS/MWS	Cat (P553)	AF132040	Yokoyama and Radlwimmer (1999)
	Horse (P545)	AF132043	Yokoyama and Radlwimmer (1999)
	Deer (P531)	AF132041	Yokoyama and Radlwimmer (1999)
	Guinea pig (P516)	AF132042	Yokoyama and Radlwimmer (1999)
	Squirrel (P532)	AF132044	Yokoyama and Radlwimmer (1999)
	Goat (P553)	U67999	Radlwimmer and Yokoyama (1997)
	Rabbit (P509)	AF054235	Radlwimmer and Yokoyama (1998)
	Mouse (P508)	AF011389	Sun et al. (1997)
	Rat (P509)	AF054241	Radlwimmer and Yokoyama (1998)
	Dolphin (P524)	AF055457	Faick et al. (1998)
	Human (P530)	K03490	Oprian et al. (1991)
	Human (P552)	M13300*	Merbs and Nathans (1992)
	Human (P560)	M13300	Oprian et al. (1991)

* see also Winderickx et al. (1992).

The numbers after P refer to $\lambda_{\max}$ values. Alligator, *Alligator mississippiensis*; Bovine, *Bos taurus*; Bullfrog, *Rana catesbeiana*; Carp, *Cyprinus carpio*; Canary, *Serinus canaria*; Cat, *Felis catus*; Cavefish, *Astyanax fasciatus*; Chameleon, *Anolis carolinensis*; Chicken, *Gallus gallus*; Clawed frog, *Xenopus laevis*; Coelacanth, *Latimeria chalumnae*; Conger eel, *Conger conger*; Deer, *Odocoileus virginianus*; Dog, *Canis familiaris*; Dolphin, *Tursiops truncatus*; Gecko, *Gekko gekko*; Goat, *Capra hircus*; Goldfish, *Carassius auratus*; Guinea pig, *Cavia porcellus*; Guppy, *Poecilia reticulata*; Horse, *Equus caballus*; Human, *Homo sapiens*; John Dory, *Zeus faber*; Leopard frog, *Rana pipiens*; Macaque, *Macaca fascicularis*; Marine eel, *Anguilla anguilla*; Marine lamprey, *Lamptera marinus*; Mosquito fish, *Gambusia affinis*; Mouse, *Mus musculus*; Parakeet, *Melopsittacus undulatus*; Pigeon, *Columba livia*; Rabbit, *Oryctolagus cuniculus*; Rat, *Rattus norvegicus*; River eel, *Anguilla anguilla*; River lamprey, *Lamptera japonica*; Salamander, *Ambystoma tigrinum*; Sandgoby, *Pomatoschistus minutus*; Skate, *Raja erinacea*; and Squirrel, *Sciurus carolinensis*; and Zebra finch, *Taeniopygia guttata*.

[表 2] LWS/MWS の 5 部位におけるアミノ酸置換が $\lambda_{\max}$ に及ぼす影響 (nm 単位)。

	Estimator (nm)					
Amino acids	Z	$\hat{\theta}_1$	$\hat{\theta}_2$	$\hat{\theta}_3$	$\hat{\theta}_4$	$\hat{\theta}_5$
SHYTA	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

推定値に関連付けられた標準エラーはすべて ± 1 nm 以内です。 $\hat{\theta}_1$ 、 $\hat{\theta}_2$ 、 $\hat{\theta}_3$ 、 $\hat{\theta}_4$ 、 $\hat{\theta}_5$ 、および Z は、それぞれ s180a、h197y、y277f、t285a、a308s、および他の残基のアミノ酸によって引き起こされる $\lambda_{\max}$ シフトの大きさをそれぞれ、それぞれ色として、他の残留として示します。

負の $\hat{\theta}_i$ 、値はアミノ酸が反対方向に変化します (横山と Radlwimmer 1999 から修正された)。

[図 1] $\lambda_{\max}$ を 5 nm 以上変化させる部位特異的変異のまとめ。黒丸は有意なシフト、斜線は 5 nm 未満/なし。

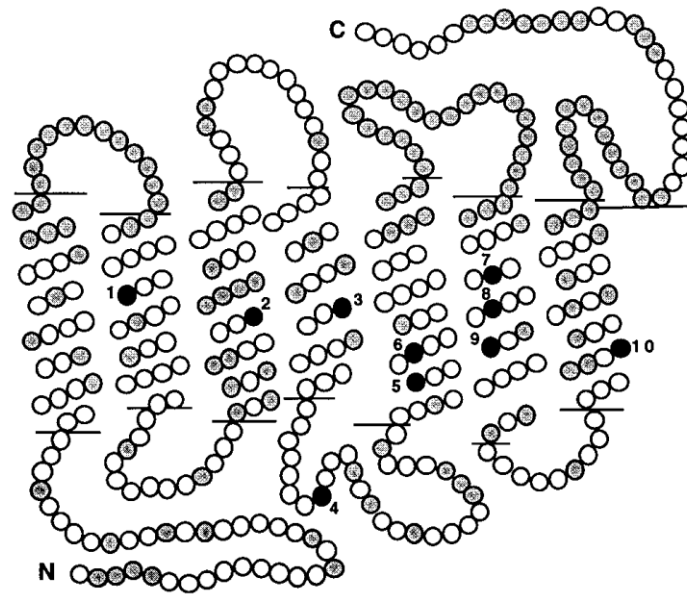


図 1. 部位特異的変異誘発の編集の結果。 $\lambda_{\max}$ 値が 5 nm 以上変化するアミノ酸の変化 (1~10) は黒丸で示されています。変化しないか、 $\lambda_{\max}$ 値が 5 nm 未満に変化するものは、点描の円で示されています。後者の変異体グループは、さまざまな著者によってウシのロドプシンを用いて組み立てられています。

データソース: 変異体 1 (ウシのロドプシンの D83N (-6 nm), Nathans 1990a, b); 2 (ウシのロドプシンの E122Q (-19 nm), Nathans 1990a, b; シーラカンスの RH1 (10 nm) と RH2 (13 nm) 色素の Q122E, Yokoyama et al. 1999); 3 (ヒトの LWS 色素の S180A (-7 nm), Asenjo et al. 1994); 4 (ヒトの LWS 色素の H197Y (-28 nm), Sun et al. 1997); 5 (シーラカンスの RH2 色素の L207M (6 nm), Yokoyama et al. 1999, ウシのロドプシンの 611211C (-5 nm), Nathans 1990a), 7 (ウシロドプシン (10 nm) の F261Y, Chan et al. 1992, ヒト LWS 色素 (-10 nm) の Y277F, Asenjo et al. 1994, 洞窟魚 RH1 色素 (-85nm) の Y261F, Yokoyama et al. 1995; 8 (ウシロドプシン 1-15 nm の W265Y), Nakayama and Khorana 1991; ウシロドプシン (14 nm) の A269T, Chan et al. 1992; ヒト LWS 色素 (-16 nm), Asenjo et al. 1994 および 10 (ウシロドプシン 1-10 nm の A2928), Sun et al. 1997; マウス MWS 色素 (15 nm), Sun et al. 1997, シーラカンスの RH1 色素の 8292A (8 nm), Yokoyama et al. 1999, イルカの MWS 色素の 8292A (128 nm), Fasick and Robinson 1995

[図 2] RH1 祖先系統における高度保存残基の置換。青方偏移の色素を枠で表示。

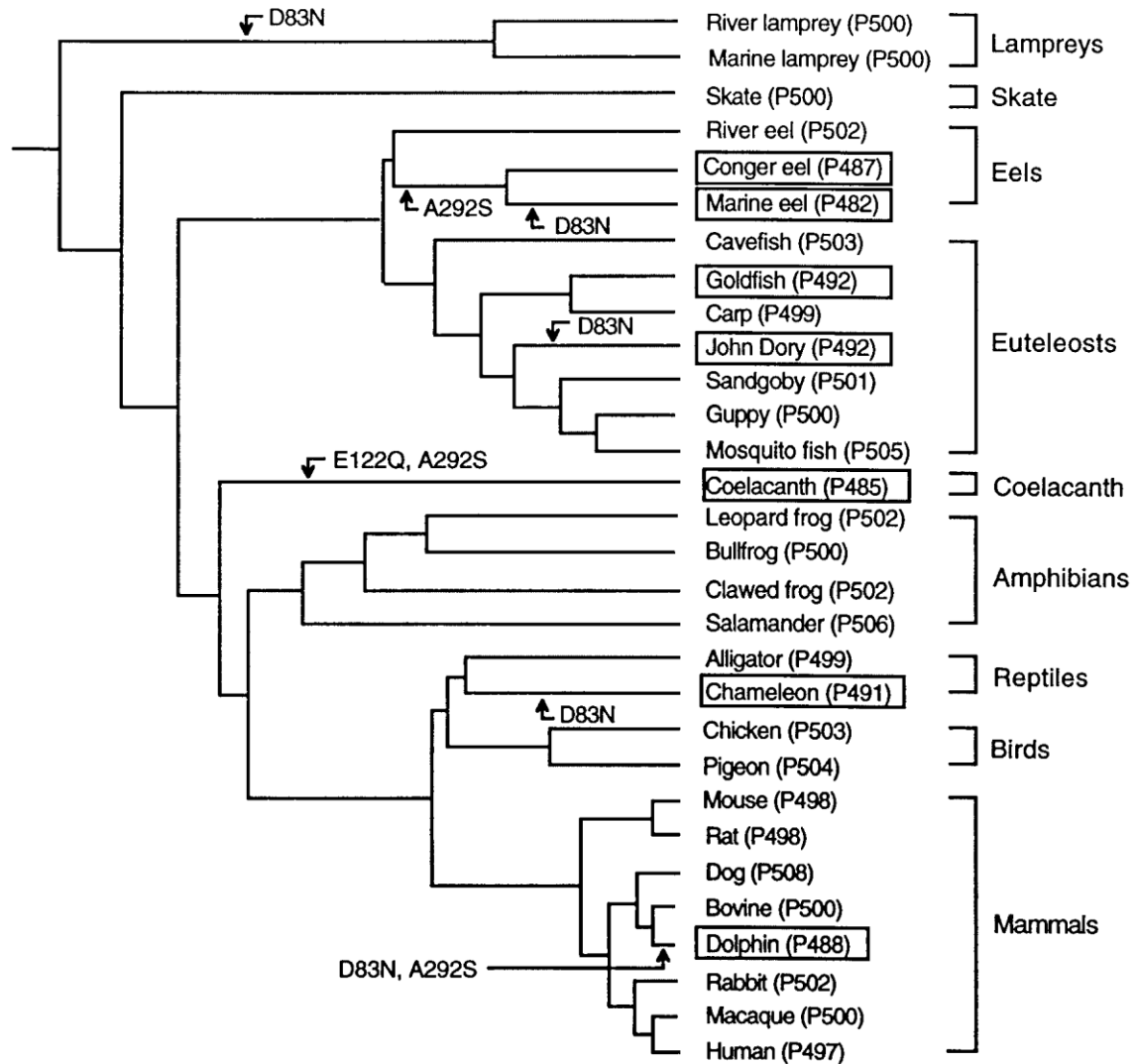


図 2. 祖先 RH1 色素の高度に保存された残基におけるアミノ酸の置換を矢印で示します。Yokoyama 2000b、 $\lambda_{\max}$ 値が青方偏移した色素は四角で示します。ツリートポロジーは主に生物ツリーに基づいており、ウナギ、内骨魚類、両生類、哺乳類内の詳細な系統関係は、アラインメントされたアミノ酸配列データに NJ 法 (Saitou and Nei 1987) を適用することで得られています。

[図 3] RH1 での D83N, Q122E, A292S、RH2 での D83N, Q122E, A164S, M207L の位置（ロドプシン模型上）。

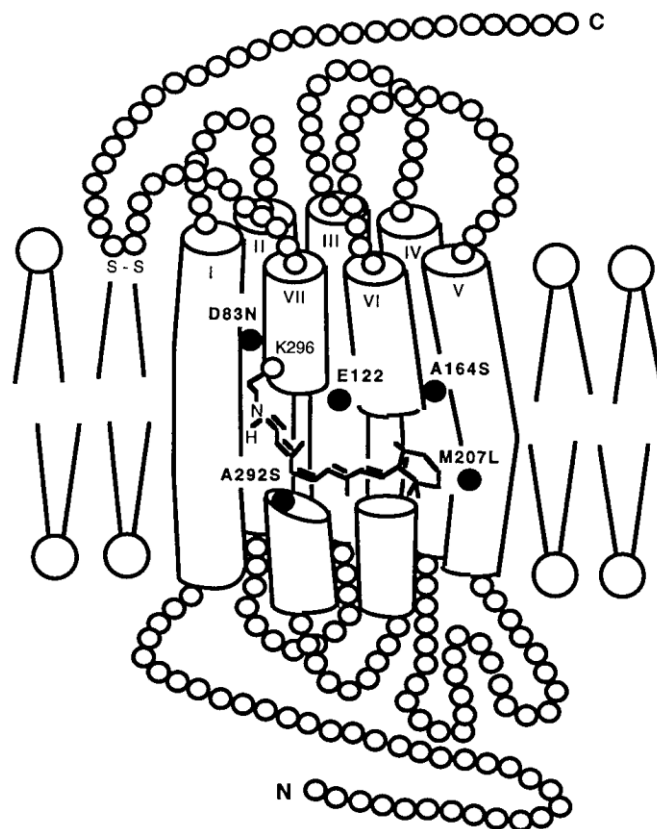


図 3。RH1 色素群のアミノ酸置換 D83N、Q122E、および A292 の位置と D83N、Q122E、A164S、および A164S、および RH2 色素群の M207L。ウシロドプシンのモデルは、Applebury (1990) から取られています。ここでは 7 つの膜貫通ヘリックスは、弟子内のアミノ末端および II-III、IV-V、および VI-VII ループ、および細胞質カルボキシ末端および VI-VII ループと一緒に I-II、III-IV、および V-VI ループも示されています。11-cis-retinal は K296 にリンクされています

[図 4] RH2 祖先系統での高度保存残基の置換。

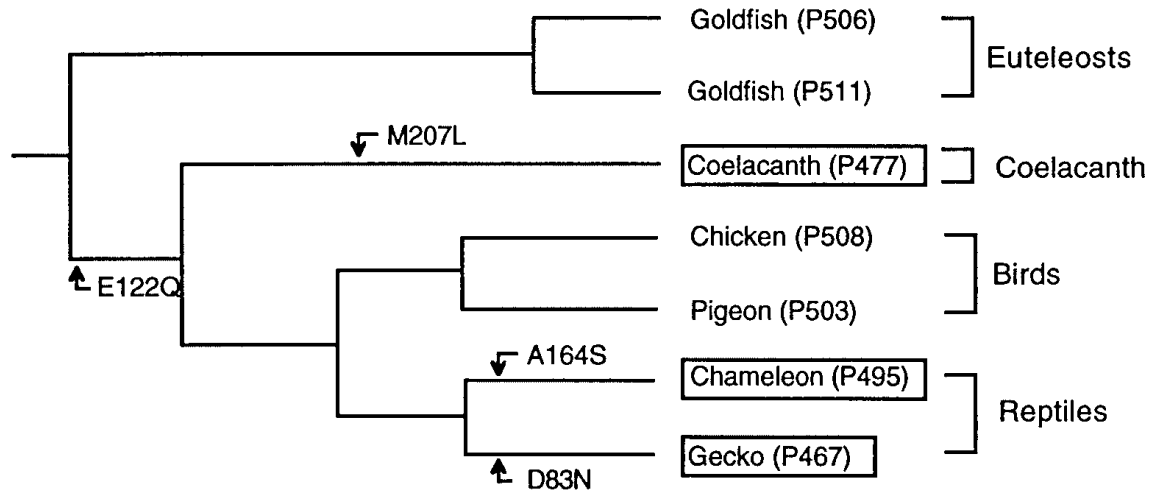


図 4。先祖の RH2 色素の高度に保存された残留物でのアミノ酸置換 (横山 2000b)

[図 5] 鳥類 SWS1 祖先での高度保存残基置換（ブートストラップ支持率付き）。

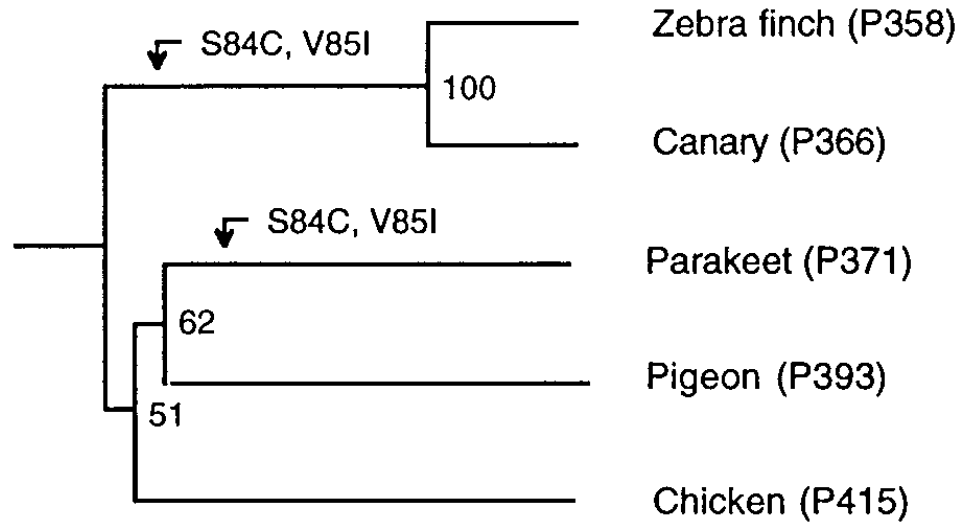


図 5。先祖の鳥 SWS1 色素の高度に保存された残基でのアミノ酸置換。系統樹は、ポアソン補正を使用して整列したアミノ酸配列データに NJ メソッドを適用することにより構築されました。さまざまなノードの横にある数字は、1,000 のブートストラップ複製によって生成されるクラスタリングパーセントサポートです (Felsenstein 1985)

[図 6] LWS/MWS の波長感度を規定する 5 つの重要残基。

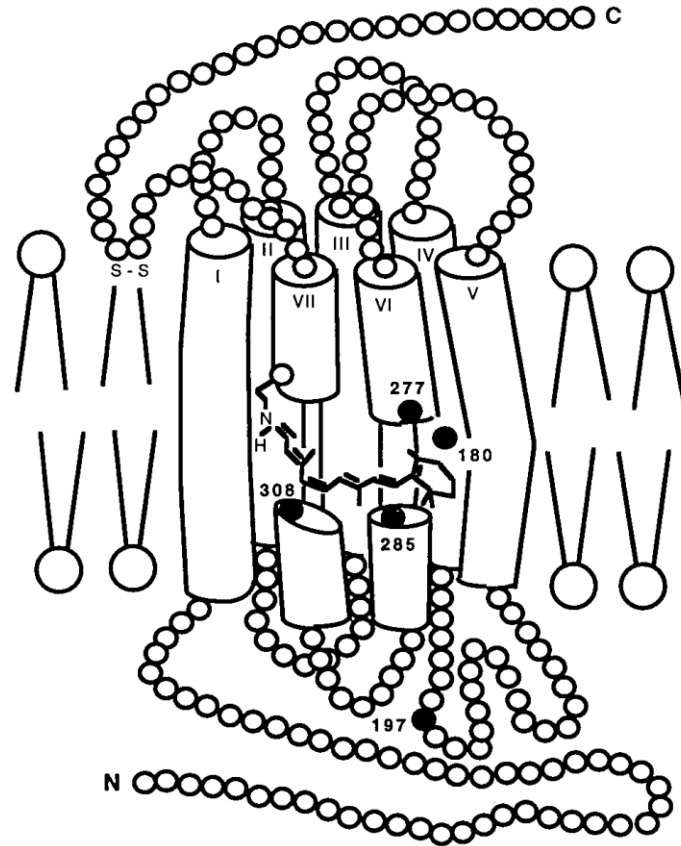


図 6. LWS/MWS 色素の可変波長感受性を決定する上で重要な 5 つの重要なアミノ酸残基。

[図 7] 哺乳類祖先における 5 部位の置換と推定 $\lambda_{\max}$ (5 部位規則による予測)。

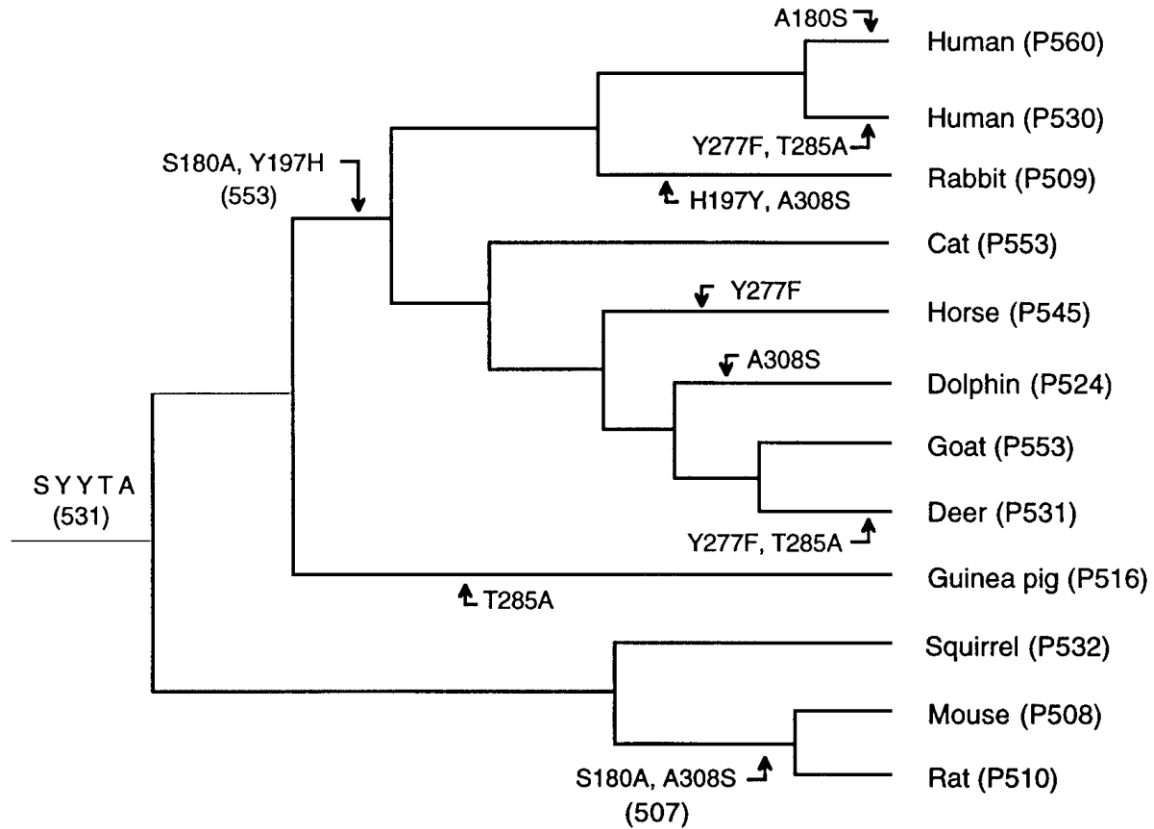


図 7.先祖哺乳類の色素の 5 つの重要な残基でのアミノ酸置換。ブランチ以外の数値は、「5 サイト」ルール (Yokoyama and Radlwimmer (1999) から修正された $\lambda_{\max}$ 値が予測されます。

参考文献

- Applebury, M. L. (1990) Insight into blindness. *Nature* **343**, 316–317.
- Archer, S. N. and Hirano, J. (1996) Absorbance spectra and molecular structure of the blue-sensitive rod visual pigment in the conger eel (*Conger conger*). *Proc. R. Soc. Lond. B* **263**, 761–767.
- Archer, S. N. and Hirano, J. (1997) Opsin sequences of the rod visual pigments in two species of Poeciliid fish. *J. Fish Biol.* **51**, 215–219.
- 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) The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **12**, 1693–1670.
- Baldwin, M. (1994) Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 180–190.
- Batni, S., Scalzetti, L., Moody, S. A. and Knox, B. E. (1996) Characterization of the *Xenopus* rhodopsin gene. *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) The visual pigments of some common laboratory mammals. *Nature* **184**, 1727–1728.
- Chan, T., Lee, M. and Sakmar, T. P. (1992) Introduction of hydroxyl-bearing amino acids causes bathochromic spectral shifts in rhodopsin: amino acid substitutions responsible for red-green color pigment spectral tuning. *J. Biol. Chem.* **267**, 9478–9480.
- Chen, N., Ma, J.-X., Corson, D. W., Hazard, E. S. and Crouch, R. K. (1996) Molecular cloning of a rhodopsin gene from salamander rods. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**, 1907–1913.
- Cornwall, M. C., Ripps, H., Chappell, R. L. and Jones, G. J. (1989) Membrane current responses of skate photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* **94**, 633–647.
- Crescitelli, F. and Dartnall, H. J. A. (1953) Human visual purple. *Nature* **172**, 195–196.
- Crescitelli, F. and Dartnall, H. J. A. (1954) A photosensitive pigment of the carp retina. *J. Physiol.* **125**, 607–627.
- Dartnall, H. J. A. and Lythgoe, J. N. (1965) The spectral clustering of visual pigments. *Vision Res.* **5**, 81–100.
- Das, D., Wilkie, S. E., Hunt, D. M. and Bowmaker J. K. (1999) Visual pigments and oil droplets in the retina of a passerine bird, the canary, *Serinus canaria*: microspectrophotometry and opsin sequences. *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) Mechanism of spectral tuning in the dolphin visual pigments. *Biochemistry* **37**, 432–438.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.
- Hargrave, P. A., McDowell, J. H., Curtis, D. R., Wang, J. K., Jaszczak, E., Fong, S. L., Mohanna Rao J. K. and Argos, P. (1983) The structure of bovine rhodopsin. *Biophys. Structural Mech.* **9**, 235–244.
- Harosi, F. I. (1994) Analysis of two spectral properties of vertebrate visual pigments. *Vision Res.* **34**, 1359–1369.
- Harosi, F. I. and Kleinschmidt, J. (1993) Visual pigments in the sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *Vis. Neurosci.* **10**, 711–715.
- Hisatomi, O., Iwasa, T., Tokunaga, F. and Yasui, A. (1991) Isolation and characterization of lamprey rhodopsin cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **174**, 1125–1132.
- Hisatomi, O., Kayada, S., Aoki, Y., Iwasa, T. and Tokunaga, F. (1994) Phylogenetic relationships among vertebrate visual pigments. *Vision Res.* **34**, 3097–3102.
- Hope, A. J., Partridge, J. C., Dulai, K. S. and Hunt, D. M. (1997) Mechanisms of wavelength tuning in the rod opsins of deep-sea fishes. *Proc. R. Soc. Lond. B* **264**, 155–163.
- Jacobs, G. H. (1993) The distribution and nature of colour vision among the mammals. *Biol. Rev.* **68**, 413–471.
- Johnson, R., Grant, K. B., Zankel, T. C., Boehm, M. F., Merbs, S. L., Nathans, J. and Nakanishi, K. (1993) Cloning and expression of goldfish opsin sequences. *Biochemistry* **32**, 208–214.
- Kawamura, S., Blow, N. S. and Yokoyama, S. (1999) Genetic analyses of visual pigments of the pigeon (*Columba livia*). *Genetics* (in press).
- Kawamura, S. and Yokoyama, S. (1998) Functional characterization of visual and nonvisual pigments of American chameleon (*Anolis carolinensis*). *Vision Res.* **38**, 37–44.
- Kayada, S., Hisatomi, O. and Tokunaga, F. (1995) Cloning and expression of frog rhodopsin cDNA. *Comp. Biochem. Physiol.* **110B**, 599–604.
- Kojima, D., Okano, T., Fukada, Y., Shichida, Y., Yoshizawa, T. and Eberty, T. G. (1992) Cone visual pigments are present in gecko rod cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6841–6845.
- Merbs, S. L. and Nathans, J. (1992) Absorption spectra of human cone pigments. *Nature* **356**, 433–435.
- Merbs, S. L. and Nathans, J. (1993) Role of hydroxyl-bearing amino acids in differentially tuning the absorption spectra of the human red and green cone pigments. *Photochem. Photobiol.* **58**, 706–710.
- Nakayama, T. A. and Khorana, G. H. (1991) Mapping of the amino acids in membrane-embedded helices that interact with the retinal chromophore in bovine rhodopsin. *J. Biol. Chem.* **266**, 4269–4275.
- Nathans, J. (1989) The genes for color vision. *Sci. Am.* **260**, 42–49.
- Nathans, J. (1990a) Determinants of visual pigment absorbance: role of charged amino acids in the putative transmembrane segments. *Biochemistry* **29**, 937–942.
- Nathans, J. (1990b) Determinants of visual pigment absorbance: identification of the retinylidene Schiff's base counter ion in bovine rhodopsin. *Biochemistry* **29**, 9746–9752.
- Nathans, J. and Hogness, D. S. (1984) Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4851–4855.
- Nathans, J., Thomas, D. and Hogness, D. S. (1986) Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. *Science* **232**, 193–201.
- Neitz, M., Neitz, J. and Jacobs, G. H. (1991) Spectral tuning of pigments underlying red-green color vision. *Science* **252**, 971–974.
- Okano, T., Fukada, Y., Artamonov, I. D. and Yoshizawa, T. (1989) Purification of cone visual pigments from chicken retina. *Biochemistry* **28**, 8848–8856.
- Okano, T., Kojima, D., Fukada, Y., Shichida, Y. and Yoshizawa, T. (1992) Primary structures of chicken cone visual pigments: Vertebrate rhodopsins have evolved out of cone visual pigments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5932–5936.
- Oprian, D. D., Asenjo, A. B., Lee, N. and Pelletier, S. L. (1991) Design, chemical synthesis, and expression of genes for the three human color vision pigments. *Biochemistry* **30**, 11367–11372.
- Oprian, D. D., Molday, R. S., Kaufman, R. J. and Khorana, H. G. (1987) Expression of a synthetic bovine rhodopsin gene in monkey kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8874–

- 8878.
- Pitler, S. J., Fliesler, S. J. and Baehr, W. (1992) Primary structure of frog rhodopsin (*Rana pipiens*). *FEBS Lett.* **313**, 103–108.
- Provencio, I., Loew, E. R. and Foster, R. G. (1992) Vitamin A₂-based visual pigments in fully terrestrial vertebrates. *Vision Res.* **32**, 2201–2208.
- Radlwimmer, F. B. and Yokoyama, S. (1997) Cloning and expression of the red visual pigment gene of goat (*Capra hircus*). *Gene* **198**, 211–215.
- Radlwimmer, F. B. and Yokoyama, S. (1998) Genetic analyses of the green visual pigments of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and rat (*Rattus norvegicus*). *Gene* **218**, 103–109.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phlogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Sakmar, T. P., Franke, R. R. and Khorana, H. G. (1989) Glutamic acid-113 serves as the retinylidene Schiff base counterion in bovine rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8309–8313.
- Schertler, G. F. X., Villa, C. and Henderson, R. (1993) Projection structure of rhodopsin. *Nature* **362**, 770–772.
- Schwanzara, S. A. (1967) The visual pigments of freshwater fishes. *Vision Res.* **7**, 121–148.
- Sun, H., Macke, J. P. and Nathans, J. (1997) Mechanisms of spectral tuning in the mouse green cone pigment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8860–8865.
- Unger, V. M. and Schertler, G. F. X. (1995) Low resolution structure of bovine rhodopsin determined by electron cryo-microscopy. *Biophys. J.* **68**, 1776–1786.
- Wald, G. (1968) The molecular basis of visual excitation. *Nature* **219**, 800–807.
- Wald, G., Brown, P. K. and Kennedy, D. (1957) The visual system of alligator. *J. Gen. Physiol.* **40**, 703–713.
- Whitmore, A. V. and Bowmaker, J. K. (1989) Seasonal variation in cone sensitivity and short-wave absorbing visual pigments in the rudd *Scadinus erythrophthalmus*. *J. Comp. Physiol.* **166**, 103–115.
- Wilkie, S. E., Vissers, P. M., Das, D., deGrip, W. J., Bowmaker, 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.* **13**, 541–547.
- Winderickx, J., Lindsey, D. T., Sanocki, E., Teller, D. Y., Motulsky, A. G. and Deeb, S. S. (1992) Polymorphism in red photopigment underlies variation in color matching. *Nature* **356**, 431–433.
- Yokoyama, R., Knox, B. E. and Yokoyama, S. (1995) Rhodopsin from the fish, *Astyanax*: Role of tyrosine 261 in the red shift. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **36**, 939–945.
- Yokoyama, R. and Yokoyama, S. (1990) Convergent evolution of the red- and green like visual pigment genes in fish, *Astyanax fasciatus*, and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9315–9318.
- Yokoyama, S. (1994) Gene duplications and evolution of the short wavelength-sensitive visual pigments in vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* **11**, 32–39.
- Yokoyama, S. (1995) Amino acid replacements and wavelength absorption of visual pigments in vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 53–61.
- Yokoyama, S. (1997) Molecular genetic basis of adaptive selection: Examples from color vision in vertebrates. *Annu. Rev. Genet.* **31**, 315–336.
- Yokoyama, S. (2000a) Phylogenetic analysis and experimental approaches to study color vision in vertebrates. In: *Vertebrate Phototransduction and the Visual Cycle* (ed. K. Palczewski) *Methods in Enzymology*, Academic Press (in press).
- Yokoyama, S. (2000b) Color vision of the coelacanth (*Latimeria chalumnae*) and adaptive evolution of rhodopsin (RH1) and rhodopsin-like (RH2) pigments. *J. Heredity* (in press).
- Yokoyama, S. and Radlwimmer, F. B. (1999) The molecular genetics of red and green color vision in mammals. *Genetics* (in press).
- Yokoyama, S., Radlwimmer, F. B. and Kawamura, S. (1998) Regeneration of ultraviolet pigments of vertebrates. *FEBS Lett.* **423**, 155–158.
- Yokoyama, S. and Yokoyama, R. (1996) Adaptive evolution of photoreceptors and visual pigments in vertebrates. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **27**, 543–567.
- Yokoyama, S., Zhang, H., Radlwimmer, F. B. and Blow, N. S. (1999) Adaptive evolution of color vision of the Comoran coelacanth (*Latimeria chalumnae*). *Proc. Natl. Acad. Si. USA* **96**, 6279–6284.
- Zhukovsky, E. A. and Oprian, D. D. (1989) Effect of carboxylic acid side chains on the absorption maximum of visual pigments. *Science* **246**, 928–930.