

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。本研究では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する。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。ゲノム研究は網羅的研究の側面が強いが、個別の遺伝子についての深い探求がなければ結局全体の概略を見るにとどまる恐れがある。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。

<2008年度の研究の当初計画>

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：本研究者はこれまで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クロンを取得しており、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クロンやそれらにおいて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クロンやLCR-各遺伝子の直上領域-レポーターの直接連結コンストラクトを作成する。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。
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：本研究者はこれまでにメダカのRH2タイプオプシンの3つのサブタイプ遺伝子を含むBACクロンを取得している。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る。上述1同様にBACクロ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。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。

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クロンとメダカの2つのSWS2オプシンを含むBACクロンをすでに取得している。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。その上で必要に応じPACあるいはBACクロ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。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クロン中から見出す領域との配列相同性を再検証する。
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の豊かな魚種として、ゼブラフィッシュの属する骨鰻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。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。

<2008年度の成果>

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にもかかわらず、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局限されるのは、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クロンによっては再現される。そこでPACクロンにおいて、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。

- 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。
- 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をおこない、それらの網膜での発現を確認した。メダカ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。
- 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3種類をゲノム及びcDNAクローンとして単離した。一方RH2オプシン遺伝子は偽遺伝子化しており、失われた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。M/LWS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とは異なる独自の置換により生じていた。

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。グッピーにはM/LWSオプシンによる色覚多型の可能性が報告されており、それと整合してM/LWSに4つもの遺伝子座とその中の2座位のアミノ酸多型を見出した。原産地であるトリニダード島の集団サンプルを入手した。色覚多型への自然選択を検証するために、ゲノム支援班の協力を得て、M/LWSオプシン遺伝子の集団多型解析を行うべく準備を進めている。

トゲウオに関しては日本海型イトヨから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た。

<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従来の視物質再構成による波長測定の実験系では測定できなかった。細胞内輸送やフォールディングなどに種特異的な状況が生じているのかもしれない。

<今後の課題>

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。メダカにおけるRH2発現パターン分化の制御機構を詳細に明らかにしていく。メダカSWS2の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樹立する。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する。カーディナルテトラで独自に短波長化したM/LWSオプシン遺伝子は、近縁なメキシカンテトラのM/LWSタイプ遺伝子と比較しても異なるアミノ酸サイトが少なかった。それらのうちのどれ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。グッピーとトゲウオの測定できていない一部のM/LWSオプシン遺伝子に対して視物質再構成法を検討する。また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。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う。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行う。トゲウオの3集団間でのオプシンのレパートリー、吸収波長、発現パターンの比較を行う。

<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) .