

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657164

研究課題名（和文）水を得た魚が森を得た猿の色覚進化の謎を解く：重複オプシン遺伝子発現分化機構の解明

研究課題名（英文）Evolution of visual opsin gene expression through gene duplication manifested in fish and primates

研究代表者

河村 正二（KAWAMURA SHOJI）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：40282727

研究成果の概要（和文）：遺伝子重複による視覚オプシンの進化が顕著な魚類と霊長類に注目し、重複オプシン遺伝子の発現分化と吸収波長分化の観点から解析を行なった。同定したゼブラフィッシュの視覚オプシン制御領域を利用し、特定の視細胞を可視化することで網膜形成の理解に貢献した。グッピーの重複オプシン LWS 遺伝子に野生集団の遺伝的分化を見出した。霊長類の重複 L/M オプシン遺伝子間に遺伝子変換による均一化、ハイブリッド遺伝子形成、浄化淘汰による吸収波長の差異の保護を見出した。

研究成果の概要（英文）：Functional differentiation of visual opsin genes through gene duplication was investigated for fish and primates as a study model, in terms of differentiation in gene expression and absorption spectra. We contributed to understanding of retinal development by visualizing a subset of photoreceptor cells through opsin-class-specific promoters. We found that guppy LWS opsin genes have undergone genetic differentiation among wild populations. We showed that L and M opsin genes of primates have experienced homogenization between them by gene conversion in introns and hybridization, while spectral difference between L and M opsins appear to have been maintained by purifying selection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学、進化遺伝学、色覚進化

科研費の分科・細目：人類学・自然人類学

キーワード：オプシン、視物質、ゼブラフィッシュ、グッピー、トランスジェニック、発現制御領域、霊長類、国際情報交換

## 1. 研究開始当初の背景

明度が時間的空間的に不規則に変動する環境下において色覚は視認対象の検出同定において非常に有効である。森林と浅瀬はともにその代表的な環境であり、霊長類と魚類に色覚の顕著な高度化・多様化が生じた重要な要因と考えられている。脊椎動物の視覚光受容体である視覚オプシンは桿体視細胞で産生され薄明視を司る桿体(RH1)オプシンと錐体視細胞で産生され昼間視と色覚を司る紫

外線(SWS1)タイプ、青(SWS2)タイプ、緑(RH2)タイプ、赤(LWS)タイプの4種類の錐体オプシンからなる。哺乳類は一般的に2種類の錐体オプシンを失った2色型色覚であるが、霊長類だけは残されたSWS1タイプとLWSタイプのうちLWSタイプに対立遺伝子多型(多くの新世界ザル)あるいは遺伝子重複(主にヒトを含む狭鼻猿類)を起こしそれらの吸収波長分化と発現分化により赤～緑の識別に長けた3色型色覚に進化した。研究

代表者はモデル生物である小型淡水魚のゼブラフィッシュに2つの隣接した LWS タイプと4つの隣接した RH2 タイプ、メダカに3つの隣接した RH2 タイプと2つの隣接した SWS2 タイプのオプシン遺伝子があることを明らかにした。それらはサブタイプ間で吸収波長だけでなく、網膜中の発現領域も異にしていた。応募者はさらにゼブラフィッシュの4つの RH2 サブタイプの発現が遺伝子列の上流側に位置する単一の制御領域 RH2 Locus Control Region (LCR)により制御されていることを発見した。興味深いことに狭鼻猿類における LWS タイプオプシンのサブタイプである赤及び緑オプシン遺伝子もそれらの上流域に位置する LCR により発現制御を受けている。ゼブラフィッシュで発見された RH2-LCR とヒトで発見された LWS LCR は相同領域と考えられ、遺伝子導入実験の容易な小型魚類を使って霊長類のオプシン遺伝子発現制御のメカニズムが解明できることを示している。

## 2. 研究の目的

四足動物の中で唯一霊長類は色覚光センサーである錐体オプシンの遺伝子重複を起こし、それにより哺乳類一般の2色型色覚から赤～緑の識別に長けた独特の3色型色覚を進化させた。これには遺伝子重複したオプシンの間で吸収波長を分化させ発現細胞を異にさせる必要があった。吸収波長分化の分子メカニズムについては研究が進んでいる。しかし発現分化のメカニズムは大部分未知である。四足動物と対照的に魚類ではオプシンの遺伝子重複による色覚の多様化が顕著である。そこで本研究では重複オプシン遺伝子発現分化の要となる制御領域をモデル生物の魚類であるゼブラフィッシュへの遺伝子導入実験系を活用して明らかにすることを目的とした。また、遺伝子重複の顕著なグッピーの LWS オプシン遺伝子の遺伝的分化を野生集団において検証する。さらに霊長類の重複 L/M オプシン遺伝子に生じる均一化とそれに抗する自然選択の検証を行なう。

## 3. 研究の方法

Green fluorescence protein (GFP:緑蛍光タンパク質)等生体蛍光レポーターのゼブラフィッシュ胚への遺伝子導入系を使い、特定の視細胞を視覚化することで、網膜発生の詳細を解析する。グッピーの遺伝子重複した4つの LWS 遺伝子の塩基配列多型を野生集団で明らかにし、集団分化を定量化する。霊長類に特有な遺伝子重複産物である L オプシンと M オプシン遺伝子間の塩基相違度をエクソンとイントロンで解析することで遺伝子変換による均一化と浄化選択による吸収波長差異の維持、及び L/M ハイブリッドオプシンの形成を明らかにする。

## 4. 研究成果

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 クローンを鋳型にして、1つの遺伝子を GFP、別の1つの遺伝子を RFP レポーター遺伝子で置換した上で RH2-LCR を移設した。それら2つの遺伝子の組合せの異なる一連のコンストラクトを作成した。また、RH2-LCR-直上域-GFP コンストラクトの直下に別の遺伝子の直上域と RFP を連結させた、2つの遺伝子組合せの異なる一連のコンストラクトを作成した。これらをゼブラフィッシュ胚に導入した。

グッピー-LWS オプシン遺伝子群の発現様式を in situ hybridization と定量 PCR で調べた。それらのオプシン視物質の再構成に向けてベクターの構築と細胞系の検討を行なった。トリニダッドトバゴ由来の集団サンプルについて LWS-2 遺伝子の塩基配列決定を行なった。

我々が以前に発見したゼブラフィッシュ緑型オプシン遺伝子群発現制御領域 (RH2-LCR) と RH2-1 あるいは RH2-2 のプロモーター領域を連結し、そこに緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を連結した発現ベクターを作成した。それらを導入したトランスジェニックゼブラフィッシュラインを複数樹立した。それらの GFP の発現パターンを比較した結果、本来の網膜での緑視細胞で発現に加え、ラインにより松果体、孵化腺、視蓋、嗅球など異なる発現を示した。これは導入遺伝子のゲノム中の挿入位置効果が大きいことを再確認させる結果であると同時に、これらのラインがそれを利用した組織特異的標識体として有益なツールであることを示した。

ゼブラフィッシュの紫外線オプシンの発現制御領域下に GFP 遺伝子を置いた発現コンストラクトによるトランスジェニックゼブラフィッシュライン Tg(zfSWS1-5.5A:EGFP)、ゼブラフィッシュの赤型オプシンの発現制御領域下に GFP 遺伝子を置いた発現コンストラクトによるトランスジェニックゼブラフィッシュライン Tg(LAR:LWS2up1.8kb:GFP)#1499、ゼブラフィッシュの青型オプシンの発現制御領域下に GFP 遺伝子を置いた発現コンストラクトによるトランスジェニックゼブラフィッシュライン Tg(zfSWS2-3.5A:EGFP)を過去に樹立している。それらを用いて双極細胞と視細胞との連絡パターンを解析した。その結果、視細胞との連絡パターンの異なる18種類もの双極細胞があることを明らかにした。

霊長類の重複 L/M オプシン遺伝子間に遺伝子変換による均一化、ハイブリッド遺伝子形成、浄化淘汰による吸収波長の差異の保護を見出した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

\* Corresponding author

<原著論文>

1. Fang, W., Bonaffini, S., Zou, J., Wang, X., Zhang, C., Tsujimura, T., Kawamura, S. and \*Wei, X. (2013). Characterization of transgenic zebrafish lines that express GFP in the retina, pineal gland, olfactory bulb, hatching gland, and optic tectum. **Gene Expression Patterns**, 13 (5-6): 150-159. (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gep.2013.02.006>
  2. \*Li, Y. N., Tsujimura, T., Kawamura, S. and Dowling, J. E. (2012). Bipolar cell-photoreceptor connectivity in the zebrafish (*Danio rerio*) retina. **The Journal of Comparative Neurology**, 520 (16): 3786-3802. (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.1002/cne.23168>
  3. Hiwatashi, T., Mikami, A., Katsumura, T., Suryobroto, B., Perwitasari-Farajallah, D., Malaivijitnond, S., Siriaroonrat, B., Oota, H., Goto, S. and \*Kawamura, S. (2011). Gene conversion and purifying selection shape nucleotide variation in gibbon L/M opsin genes. **BMC Evolutionary Biology**, 11: 312. (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-11-312>
- <総説>
4. \*河村正二 (2012). 視覚センサー遺伝子の適応と進化多様性: 魚類から霊長類まで. **化学と生物**, 50 (5): 325-336. (査読有)

[学会発表] (計 33 件)

1. 河村正二: 魚類をモデルとした色覚進化の適応的柔軟性の検討. 三重大学 COE-A (世界に誇れる世界トップレベルの研究拠点)「魚類をモデルとした生物多様性と次世代型ポストゲノム教育研究拠点」シンポジウム「色覚・光受容機能の多様性・環境応答とその応用」、三重大学生物資源学部、津、2013年1月23日。(口演) (Invited)

2. Kawamura, S.: Molecular mechanism and adaptive significance of evolutionary diversification of visual opsins. **The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan: Symposium 38: Functional evolution of sensing receptors: Toward the comprehensive understanding by fusion of research in the different fields (Organized by Makoto Tominaga and Hioo Imai)**, Shinshu University Matsumoto Campus, Matsumoto, Japan, March 29-31, 2012. (Oral) (Invited)
3. 河村正二: 魚類と霊長類の研究から見えてきた色覚進化の秘密. 日本塗装技術協会 第 27 回塗料・塗装研究発表会、東京大学生産技術研究所、駒場リサーチキャンパス・コンベンションホール、駒場、2012年3月9日。(口演) (Invited)
4. 河村正二: 色覚進化研究の人類学的展開: 魚類と霊長類に見られる視覚光センサーの進化多様性を通して. 北里大学海洋分子生物学特別セミナー、北里大学相模原キャンパス、神奈川、2011年12月2日。(口演) (Invited)
5. Kawamura, S.: Evolution of visual opsin genes in fish and primates. **15th Evolutionary Biology Meeting at Marseilles (15th EBM)**, Regional Center of Educational Documentation ("Centre Regional de Documentation Pédagogique"), Marseilles, France, September 27-30, 2011. (Oral) (Invited)
6. Kawamura, S.: Evolutionary study of vertebrate color vision: from fish transgenesis to field primatology, and to human variation. **Annual Conference of Society for Molecular Biology and Evolution 2011 (SMBE 2011)**, Kyoto University (Clock Tower Centennial Hall and Shiran Kaikan) and Miyako Messe, Kyoto, Japan, July

26-30, 2011. (Oral) (Invited)  
Plenary Talk

〔図書〕 (計 3 件)

\* Corresponding author

1. \*Melin, A. D., Hiramatsu, C., Fedigan, L. M., Schaffner, C. M, Aureli, F. and \*Kawamura, S. (2012). Polymorphism and adaptation of primate colour vision. In: Evolutionary Biology: Mechanisms and Trends (Pontarotti, P. ed.), pp. 225-241, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. ( 査 読 有 )  
[http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-30425-5\\_13](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-30425-5_13)
2. \*河村正二 (2012). 第 8 章コラム : 霊長類型 3 色型色覚をめぐる「謎」. In: 進化 : 生命のたどる道 (長谷川真理子 日本語版監修), pp. 208-209, 岩波書店. 原著 : Carl Zimmer (2010). The Tangled Bank: An Introduction to Evolution, Roberts and Company Publishers, Greenwood Village, Colorado. (査読有)  
<http://www.iwanami.co.jp/moreinfo/0054670/top.html>
3. \*Kawamura, S., Hiramatsu, C., Melin, A. D., Schaffner, C. M, Aureli, F. and Fedigan, L. M. (2012). Polymorphic color vision in primates: evolutionary considerations. In: Post-Genome Biology of Primates (Hirai, H., Imai, H. and Go, Y. eds.), pp. 93-120, Springer, Tokyo. ( 査 読 有 )  
[http://dx.doi.org/10.1007/978-4-431-54011-3\\_7](http://dx.doi.org/10.1007/978-4-431-54011-3_7)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jinrui.ib.k.u-tokyo.ac.jp/kawamura-home.html>

<http://www.jinrui.ib.k.u-tokyo.ac.jp/kawamura-home-E.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 正二 (KAWAMURA SHOJI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号 : 40282727

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし