

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570113

研究課題名(和文) 魚類における生息水深への色覚適応と種多様性形成の関連

研究課題名(英文) Adaptation of visual pigment classes to habitat depths and its relation on fish diversity

研究代表者

宮崎 多恵子 (MIYAZAKI, Taeko)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：60346004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：深海から表層域へと鉛直方向に分散したサバ亜目について錐体オプシン遺伝子の発現を調べた。その結果、表中層性のゴマサバとマラルソウダは緑および青オプシン遺伝子が各1種類であるのに、より表層に生息するアカカマスは両遺伝子が2種類ずつに重複していた。他方、深層に生息するタチウオとクロタチカマスからは青オプシン遺伝子は単離されず、緑オプシン遺伝子を持つものの、ロドプシン遺伝子の発現が多いことが示された。

研究成果の概要(英文)：Expressions of cone opsin genes in the retinas of fish species belonging suborder Scombroidei were investigated. Each of *Scomber australasicus* and *Auxis rochei*, which are pelagic species, had single green (RH2) and blue (SWS2) opsin gene. *Sphyrna pinguis* living more upper layer than those species, duplicated both genes of RH2 and SWS2. The two abyssal species of *Trichiurus lepturus* and *Gempylus serpens* had RH2 gene, however, SWS2 gene was not isolated from either of them. Rod-opsin (RH1) gene was dominantly expressed class in these two deeper species.

研究分野：魚類生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：オプシン 色覚 種多様性 生息水深 環境適応

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 海産魚類における色覚研究の必要性：

魚類は脊椎動物の中で最も種多様性に富む生物群であり、種ごとに異なる水域・水深の光環境に適応・繁栄している。とくに、地球の約7割の面積を占め、かつ水平・垂直方向に大きな広がりをもつ海洋で繁栄する魚類の光受容器は、陸上動物よりもはるかに高感受性と多様性に富んでいる。

光は水によって減衰するが、その減衰特性は波長によって異なる。紫外線のような短波長光や600nm以上の長波長光はごく表層で減衰し深層まで届かない。一方、500nm付近の中波長光は深海まで透過する。このような波長の透過特性を考えた場合、魚類の色覚研究においては、「色覚の多様性と生息水深の関係」というテーマへの着想はさほど非凡ではない。その解析アプローチとしては、天然の、かつ同じ分類群の種で行うのが適当であると誰しもが考える。しかし試料入手の困難性や分類学的位置づけの高専門性が壁となる。また、選択した分類群の種組成が大きすぎたり、魚種間の生息水深差が小さすぎたりすれば、得られるデータは結果を導くのに必要十分を満たさない可能性がある。たとえ条件を満たす魚類グループであったとしても、遺伝子解析や組織標本の作製に適した新鮮網膜を種網羅的に準備することは非常に難しく、研究着手は容易ではない。このため、海産魚類の光受容器遺伝子ファミリーの探索、色覚バリエーションの機能性や生態的意義に関する情報は断片的である。

### (2) 魚類色覚研究におけるサバ亜目魚類の有効性：

申請者はこれまで、様々な海産魚類についてRT-PCRによる色覚オプシン遺伝子の発現を調べてきた。その過程で、表層性の魚種においては赤(LWS)、緑(RH2)、青(SWS2)および紫外線(SWS1)のオプシン遺伝子による4色色覚型が多いこと、それらの種はLWSと

SWS1がユニバーサルプライマーを用いたPCRや遺伝子特異的プライマーによるRACE法で効率よく増幅されるのに、RH2やSWS2は増幅されにくいこと、一方、中層性の魚種ではRH2やSWS2が増幅されやすく、LWSやSWS1は種々の特異的プライマーを使用しても単離されないことを経験してきた。

オプシン遺伝子は系統進化の過程で祖先種から継承される形質であるとともに、近縁種であっても生息域の波長特性の違いで発現しないオプシンクラスがあったり、あるいは、重複によりアミノ酸配列を少しずつ変異させた複数種類の同一オプシンクラスを発現したりするなど、環境適応的一面がみられる。

そこで注目したのが、海洋のみに生息し、表層から水深1000m付近まで鉛直方向に種を多様に分化させてきたサバ亜目魚類である。本亜目は深海性の種を祖先にもち、種を分化させながら中深層に進出してきたとされており、種分化過程でオプシン遺伝子をどのように継承・重複・消失してきたかを調べるのに非常に有効なモデルグループであると考えた。サバ亜目魚類においては、色覚というセンサーが多様性形成メカニズムに大きく関与しているのではないかと推測した。

## 2. 研究の目的

本研究では、深海から表層域へと鉛直方向に分散したサバ亜目魚類をモデルとして、本亜目に属する様々な魚種における錐体オプシン遺伝子のバリエーションを明らかにすることを目的とした。単離された遺伝子の塩基配列をもとに分子系統解析を行うことにより、各色覚遺伝子の重複および種への継承・消失の分子機構を検討するとともに、各魚種が分布する水中の波長分布との関係を比較した。また、網膜全体における錐体視細胞の分布パターンについても解析を行い、見る角度による色覚の違い等と食性や行動様式との関係を議論した。これらを総合するこ

とにより、サバ亜目魚類が種分化の過程で、異なる水深の光波長組成に対して色覚をいかに適応させ、種や行動生態の多様性を形成してきたかをさぐることを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 錐体オプシン遺伝子の単離

冷凍標本の眼球から市販キットにより網膜 total-RNA を抽出し、RT-PCR 法により 1 本鎖 cDNA に逆転写後、5' 末端に G-tail を付加した。これをテンプレートにして魚類オプシン遺伝子特異的プライマーとアダプタープライマーを用いた 3'-ならびに 5'-RACE を行い、各波長の色覚オプシン遺伝子全長配列を決定した。並行して、冷凍筋肉から抽出・精製したゲノム DNA をテンプレートにしたサザンハイブリダイゼーションを行い、遺伝子コピーの有無を確認した。複数バンドが確認された場合はゲノミックオプシン遺伝子の全長配列を決定し、同配列から新たに設計した特異的プライマーで再度 RACE を行うことで未単離のオプシン遺伝子の発現を確認した。

#### (2) 錐体オプシン遺伝子の分子系統解析

決定された錐体オプシンのアミノ酸配列による分子系統樹を作成し、同亜目内における錐体オプシン遺伝子の分子進化を解析した。また、コイ類やサケ類など、系統的に原始的な魚類グループのオプシン遺伝子を引用して系統解析を行い、魚類オプシンの祖先遺伝子が魚類種多様化の中でどのように継承されているかを検討した。

#### (3) 錐体細胞の分布解析

ホルムアルデヒドやブアン氏液で固定された網膜を、網膜全体内での位置が確認できるように約 5mm 四方の小片に分割し、常法によるパラフィン横断および縦断組織標本作製した。すべての小片について光学顕微鏡で視細胞層を観察し、各網膜部位に存在する錐体細胞の種類とモザイク配列のタイプを解析した。結果を視角による色覚の違いの推

定に使用した。

### 4. 研究成果

実験は上部表層性のアカカマス(カマス科)、下部表層性のマルソウダ(サバ科)、表~中層性のゴマサバ(サバ科)、中層性のクロタチカマス(クロタチカマス科)および、中深層性のタチウオ(タチウオ科)について行った。

#### (1) ユニバーサルプライマーによる遺伝子検索

全てのオプシン遺伝子に相同性をもつユニバーサルプライマーセットによる PCR を行い、増幅産物について各魚種につきそれぞれ 15 クローンをシークエンスしたところ、アカカマスでは配列が異なる 2 種類の RH2 クラスが各 4 個、2 種類の SWS2 クラスが 5 個と 2 個得られた。ヒラソウダでは各 1 種類の RH2 と SWS2 がそれぞれ 7 個と 8 個、ゴマサバでは RH2 と SWS2 が各 9 個と 6 個であった。タチウオとクロタチカマスにおいては 15 個全てがロドプシン(RH1)クラスであった。いずれの魚種においても LWS、SWS1 クラスは含まれていなかった。

#### (2) RH2 および SWS2 遺伝子全長配列

アカカマス、マルソウダ、ゴマサバで得られた RH2 と SWS2 遺伝子に関してはそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを設計して 3'-および 5'-RACE を行い、全長配列を決定した(表 1)。一方、タチウオとクロタチカマスについては、アカカマスとゴマサバで使用した種々のプライマーを幾通りかで組み合わせ PCR を行ったところ、青オプシン遺伝子断片は得られなかったものの、緑オプシン遺伝子断片が得られた。しかし、全長配列の決定には至らなかった。

表1. 単離されたオプシン遺伝子配列の長さ

	RH2	SWS2
アカカマス	1056bp (352AA) 1035bp (345AA)	1053bp (351AA) 1056bp (352AA)
マルソウダ	1065bp (355AA)	1059bp (353AA)
ゴマサバ	1035bp (345AA)	1056bp (352AA)
クロタチカマス	581bp frag.	-
タチウオ	337bp frag.	-

### (3) 錐体細胞配列

アカカマス、マルソウダ、ゴマサバの網膜には単錐体と複錐体が存在した。アカカマスの錐体モザイク配列は網膜全体で一様で、複錐体が軸を同じ方向へ向け、単錐体と複錐体が平行に並ぶ配列であった。マルソウダとゴマサバは、吻側から背側にかけての網膜では複錐体が優先し、所々に単錐体が出現した。ゴマサバの腹側尾側の網膜はアカカマスのような複錐体と単錐体が交互に並ぶ配列であった。マルソウダの腹側尾側の網膜も同様な分布のように観察されたが、細胞の大きさがゴマサバよりも非常に小さく、かつ密に分布し、モザイク配列の詳細確認は困難であった。クロタチカマスとタチウオは網膜全体で小さな細胞が分布し細胞の形が不明瞭であり、錐体細胞の種類や配列の確認ができなかった。

以上の結果より、ゴマサバとマルソウダは緑および青オプシン遺伝子が各1種類であるのに、より表層に生息するアカカマスでは両遺伝子が2種類ずつに重複していることが明らかになった。他方、これらの種よりも深層に生息するタチウオとクロタチカマスからは青オプシン遺伝子は単離されず、緑オプシン遺伝子を持つものの、ロドプシン遺伝子の発現が多いことが示された。一方で、今回実験に供した4種では、いずれの魚種からもSWS1やLWSオプシン遺伝子は単離されなかった。先に申請者が報告したクロマグロでのオプシン発現もゴマサバやヒラソウダと同じであった。つまり、本亜目魚類は種分化の過程で青～緑域に色覚を適応させながらも、深

層に潜行したものは青色覚を消失して、その層に豊富な緑域波長に色覚を特化させ、逆に光が豊富な表層に進出したものは、遺伝子重複により同波長域における色覚能力を上げていったことが示唆された。そして、深い水深に生息するものは緑色盲となり、色覚ではなくむしろロドプシンによるコントラスト視を行っていると考えられた。

錐体細胞の分布から推定される見る角度による色覚の違いに関しては、一般に、単錐体にはSWS2またはSWS1の短波長視物質を、複錐体にはRH2またはLWSの長波長視物質を含むとされていることから、アカカマスは網膜全体で緑と青の光を均一に受容し、ヒラソウダやゴマサバでは、腹側網膜では青と緑の光を、背側網膜では緑の光を受容していると推定された。クロマグロの錐体細胞分布もゴマサバ、ヒラソウダに類似している。

つまり、表層には幅広い波長の光が豊富に分布していることから、アカカマスは網膜全体に青～緑域の優れた色覚を有していると推察される。これよりやや深い水深に生息するゴマサバとヒラソウダは前方斜め上方向の視角においては水面方向から入射する青色光を利用するのに対し、腹側方向から前方斜め下方向の視角においては海底からの反射光の大部分を構成する緑域の光を利用していると推察された。深海性のタチウオとクロタチカマスでは錐体細胞は発達せず、桿体細胞を多く持つのかもしれないと考えられた。

### (4) SWS2とRH2の分子進化

サバ亜目魚類のSWS2とRH2について、他の硬骨魚類の塩基配列を引用し近隣接合法による系統樹を作製した。SWS2(図1)は祖先型から骨鰾類、原棘鱗類と順に分岐した後、新真骨類として大きなクラスターを形成した。新真骨類の中では、サバ亜目はアカカマスとその他の魚種が側系統性を示した。アカカマスはカレイ目およびSWS2を2つもつカ

ワスズメ類、カダヤシ類の片方の遺伝子とクラスターを形成し、その他のサバ亜目はフグ目およびカワスズメ類、カダヤシ類のもう片方の SWS2 とクラスターを形成した。このことから、カワスズメ類とカダヤシ類は新真骨類の祖先が重複させた SWS2 の両方を継承・維持したのに対し、他の新真骨類は2つのうちのいずれか片方のみを継承したと推定された。

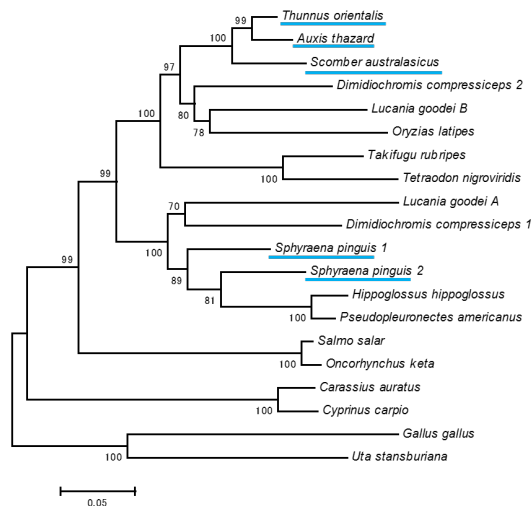


図1. SWS2遺伝子の分子系統樹

RH2 系統樹においては(図2) サバ亜目は系統樹のルートで骨鰈類から分岐し、他の硬骨魚類と大きなクラスターを形成した。同クラスター内ではサバ亜目は原棘鱗類と別れて新真骨類とクラスターを形成した。これらの分岐は魚類の系統進化に一致するものであった。新真骨類内においてはアカカマスの片方の RH2 は、同じく2つの RH2 をもつクロマグロの片方の遺伝子と共に、他のサバ亜目の RH2 とはクラスターを別にし、その他の新真骨類の中に含まれた。残るサバ亜目の RH2 は単系統性を示した。

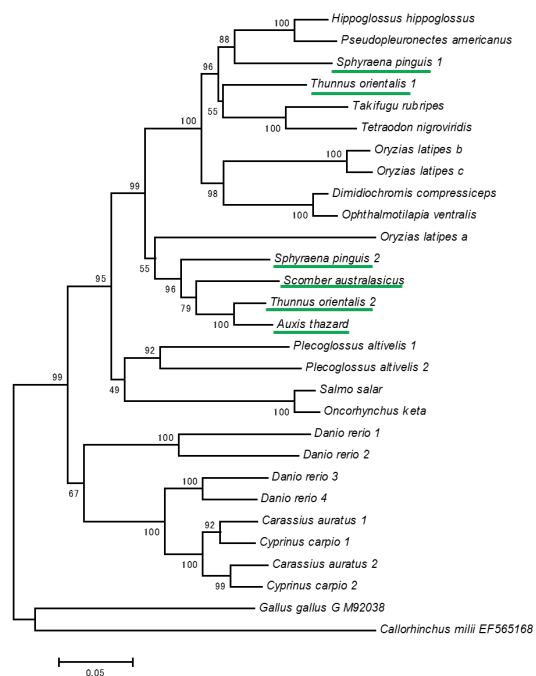


図2. RH2遺伝子の分子系統樹

## 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5件)

Miyazaki T.: Retinal ganglion cell topography in juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck and Schlegel). *Fish Physiology and Biochemistry*, 査読有, 40:23-32 (2014)

Kondrashev S.L., Miyazaki T., Lamash N.E., Tsuchiya T.: Three cone opsin genes determine the properties of the visual spectra in the Japanese anchovy *Engraulis japonicus* (Engraulidae, Teleostei). *The Journal of Experimental Biology*, 査読有, 216: 1041-1052 (2013)

Miyazaki T., Iwami T.: Molecular cloning of cDNA encoding red opsin gene in the retinas of five Antarctic notothenioid fishes. *Polar Biology*, 査読有, 35: 775-783 (2012)

Miyazaki T., Iwami T., Meyer-Rochow V.B.: The position of the retinal area centralis changes with age in *Champocephalus gunnari* (Channichthyidae), a predatory fish from coastal Antarctic waters. *Polar Biology*, 査読有, 34:1117-1123 (2011).

Miyazaki T., Nakata M., Kasagi S., Iwami T., Yamauchi M., Kawamura S.: Molecular cloning of ultraviolet-sensitive visual pigment in juvenile *Champocephalus gunnari* (Channichthyidae). *Polar Biology*, 査読有, 34:235-242 (2011).

[学会発表](計4件)

小林昌志・宮崎多恵子、日本産イワシ類3

種の眼球内構造および網膜の形態学的特徴、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 27-31 日、北海道大学（函館）  
土屋 亨・宮崎多恵子・Kondrashev Sergei L.、マイワシ色覚オプシン遺伝子のバリエーション、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 27-31 日、北海道大学（函館）

Kondrashev S.L., Gnyubkina V.P., Frolova L.T., Lamash N.E., Miyazaki T., Tsuchiya T., Multiple opsin expression and developmental aspects of cones in the Japanese anchovy *Engraulis japonicus*, European Retina Meeting, 2-5, Oct 2013, Alicante (Spain)

Iwami T., Miyazaki T., Two morphological types of *Lepidonotothen larseni* (Nototheniidae) caught along with the Antarctic krill, 34th Polar Science Symposium 26-30 Nov. 2011, National Institute of Polar Science (Tokyo)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

宮崎 多恵子 (MIYAZAKI, Taeko)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：60346004