

研究成果報告書（第29回学術研究助成）

2022年 4月 1日

公益財団法人 藤原ナチュラルヒストリー振興財団
理事長 野村茂樹 殿

所属機関名 京都大学大学院 理学研究科
職 名 博士課程1年
氏 名 藤藪 千尋

1. 研究課題

魚類の多様な光受容適応をもたらすオプシン遺伝子のユニークな重複機構の解析

2. 共同研究者

なし

3. 研究報告

I. 研究の目的

動物の知覚において、光は重要な情報源である。光情報は、ものの形や色を認識する視覚機能だけではなく、時刻や季節の認識などの様々な非視覚機能にも利用される。動物の持つこれらの多様な光受容機能に共通して関わる光受容タンパク質がオプシン類である。近年ゲノム解析により、各動物は多数のオプシン遺伝子を持つことが明らかになってきた。中でも真骨魚類は、哺乳類（10 遺伝子以下）に比べて多数のオプシン遺伝子（30~40 遺伝子）をもち、眼だけでなく脳などにも発現させる。これら多種多様なオプシン遺伝子には、アミノ酸配列や分子構造に共通性があることから、元々1つの祖先遺伝子が遺伝子重複とアミノ酸変異を繰り返すことで生み出され、さらに分子特性や発現領域を変化させることで多様な光受容機能の分子基盤を成していると考えられる。

オプシン遺伝子の多くは翻訳領域にイントロンを含み、その遺伝子構造に共通性があるため、全ゲノム重複や組換え異常、DNA トランスポゾンによる遺伝子コピー挿入などの DNA ベースの遺伝子重複機構で増加したと考えられる。しかしごく少数ながら、イントロンを含まないオプシン遺伝子も存在する。これらは、祖先型のイントロンを含む遺伝子の成熟 mRNA が逆転写され、生じた cDNA がゲノムへ挿入される retroduplication という非常にユニークな遺伝子重複機構によって獲得されたと考えられる。通常このように生じたコピーは近傍に発現調節領域を有さず、偽遺伝子化しやすいため、イントロンを含まない遺伝子が機能的に利用されている例は非常に稀である。

脊椎動物においてイントロンを含まないオプシン遺伝子は、現在のところ魚類でしか見つかっていない。そこで本研究では、代表的なイントロンを含まないオプシン遺伝子である真骨魚類のロドプシンとメラノプシンに着目し、これらの遺伝子の retroduplication が真骨魚類の多様な光受容機能の獲得にどのように貢献したのかを解明することを目的とした。

II. 研究の方法

真骨魚類はロドプシン・メラノプシン遺伝子を複数種類持ち、いずれもイントロンを含む遺伝子と含まない遺伝子の両方が存在する。ロドプシンは脊椎動物で共通して視覚の光受容体として用いるオプシンである。魚類以外の脊椎動物はイントロンを含むロドプシン遺伝子を1つのみ持ち、網膜の視細胞に発現させる一方で、真骨魚類ではイントロンを含まないものを網膜に、イントロンを含むものを時刻の認識に関わる光受容器官である脳の松果体に発現させている。またメ

ラノプシンは、哺乳類において網膜の一部の神経節細胞に発現し、時刻の認識に関わることが知られる。一方哺乳類以外の脊椎動物では複数のメラノプシン遺伝子を持っており、時刻の認識だけでなく多様な光受容機能に関わると考えられるが、解析は進んでいない。本研究では、条鰭綱において真骨魚類よりも古くに分岐した古代魚（ポリプテルス目、チョウザメ目、ガー目）及び真骨魚類のメダカのロドプシン・メラノプシン遺伝子を対象とし、以下(1)~(3)の解析を行った。得られた結果から、いつ **retroduplication** によってイントロンを含まない遺伝子が獲得され、重複した遺伝子がどのように使い分けられるようになったのかという機能分化の過程を考察した。

- (1) **遺伝学的解析**：ポリプテルス・セネガルス、シベリアチョウザメ、スポッテッドガー及びメダカのロドプシン・メラノプシン遺伝子を単離し、分子系統解析やシンテニー解析を行うことで遺伝子の重複経緯を明らかにする。
- (2) **分子特性解析**：ポリプテルス・セネガルス、シベリアチョウザメ、スポッテッドガー及びメダカのロドプシン・メラノプシンのリコンビナントタンパク質を作製し、吸収極大波長やGタンパク質活性化能、活性状態の安定性などの分子特性を比較する。
- (3) **発現領域解析**：ポリプテルス・セネガルス、シベリアチョウザメ、スポッテッドガー及びメダカの網膜と脳におけるロドプシン・メラノプシン遺伝子の発現領域を *in situ* hybridization により明らかにする。

III. 研究結果

■ ロドプシン遺伝子の多様化過程の解析

本研究にて単離、及びデータベースに登録されている条鰭綱のロドプシン遺伝子の遺伝学的解析から、ポリプテルス目は肉鰭綱と同様にイントロンを含むロドプシンを1種類のみ持ち、イントロンを含まないロドプシン遺伝子を持つのはチョウザメ目以降の種であることがわかった。また分子特性解析・発現領域解析では、真骨魚類のイントロンを含むロドプシンのみ松果体特異的に発現し、それに伴う分子特性の変化が確認された。以上の結果から、**retroduplication** はポリプテルス目の分岐以降に起こり、その後真骨魚類で独自に2種類のロドプシンを機能分化させたと考えられた。また、イントロンを含むロドプシンが松果体で機能するようになったことで、広く脊椎動物が松果体で利用する別のオブシン（ピノプシン）が機能重複したため、真骨魚類では失われたと考えられた（図1）。

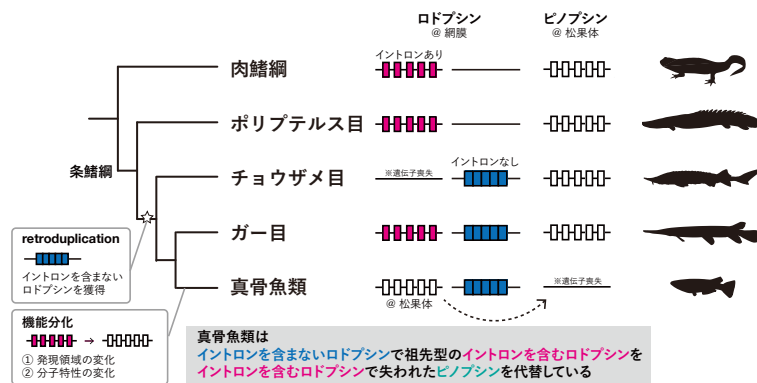


図1 条鰭綱のロドプシン遺伝子の多様化過程のモデル

■ メラノプシン遺伝子の多様化過程の解析

(1) 遺伝学的解析

本研究にて単離、及びデータベースに登録されている条鰭綱のメラノプシン遺伝子のレパートリーとシンテニー解析の結果から、ポリプテルス目は肉鰭綱と同様にイントロンを含むメラノプシンを1種類のみ持ち、イントロンを含まないメラノプシン遺伝子を持つのはチョウザメ目以降の種であることがわかった。したがって、**retroduplication** が起こったのは、ポリプテルス目の分岐以降であると考えられた。

(2) 分子特性解析

いずれのメラノプシンも青色光領域に吸収極大波長を持ち、Gq型のGタンパク質を活性化して細胞内シグナル伝達応答を誘起することが確認された。したがって、条鰭綱のメラ

ノプシンは、いずれも脊椎動物のメラノプシンにおいて共通した分子特性を持つことがわかった。

(3) 発現領域解析

ガーのメラノプシンの網膜における発現領域は、ポリプテルス・チョウザメと類似し、祖先型のイントロンを含むものの方がより顕著な発現が見られた。真骨魚類においては、メダカではガーと同様にイントロンを含むメラノプシンの発現の方がより顕著であったが、ゼブラフィッシュではイントロンを含まないメラノプシンの発現の方がより顕著であった。したがって、真骨魚類において一部の種は独自にイントロンの有無の異なる 2 種類のメラノプシン遺伝子の発現パターンを変化させていることがわかった。

以上の結果から、メラノプシン遺伝子の **retroduplication** もポリプテルス目の分岐以降に起こり、その後真骨魚類において一部の種が独自に、分子特性を維持したまま発現領域を変化させ、2 種類のメラノプシンを機能分化させていると考えられた (図 2)。

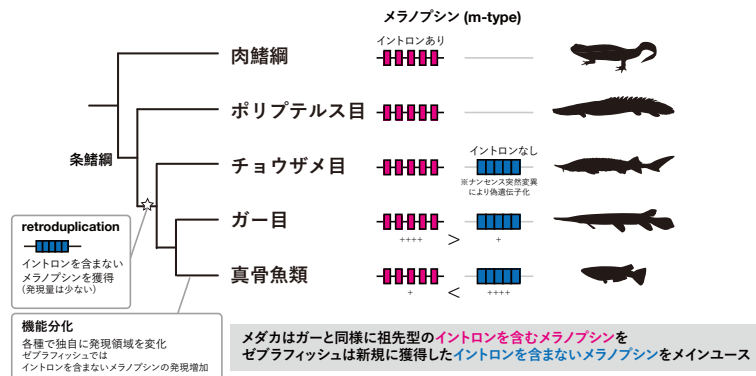


図 2 条鱗綱のメラノプシン遺伝子の多様化過程のモデル

IV. 考察

本研究結果より、イントロンを含まないロドプシン・メラノプシン遺伝子はいずれも条鱗綱の進化の初期において、真骨魚類の成立よりも古くに獲得されたということがわかった。また真骨魚類のロドプシン・メラノプシンに共通して、**retroduplication** によって新規に獲得した遺伝子を機能的に利用し、祖先型の遺伝子を代替する傾向が見られた。このように、よくみられる DNA ベースの遺伝子重複機構に加え、ユニークな RNA ベースの遺伝子重複機構によって遺伝子レパートリーを増加させることは、魚類が陸上進出していく肉鱗綱と分岐し、水中の多彩な光環境に適応して著しい種の多様化を遂げるための分子基盤として大きく貢献したと考えられる。

V. 成果発表

メラノプシン遺伝子の多様化過程の解析結果についての原著論文を執筆中であり、準備が出来次第、国際誌への投稿を行う。

VI. 今後の課題

本研究より、魚類のロドプシン・メラノプシン遺伝子の機能分化過程において、発現領域の変化が重要な要因のひとつであるとわかった。したがって、オプシン遺伝子の組織特異的な発現を調節するシス配列と発現制御機構の解明は、より詳細なエキソン/イントロン構造の異なるオプシン遺伝子の多様化過程の理解に繋がり、**retroduplication** で獲得された新規遺伝子を活用する傾向についての検討を進めることもできると考えられる。より多くの古代魚のゲノム解析が進み、オプシン遺伝子の比較解析が進展すれば、本研究で提唱した進化モデルの更なる検証も可能である。また、魚類の持つ複数のメラノプシン遺伝子と実際の生理機能との関連は未だ明らかになっておらず、機能重複している可能性も残っている。今後は光応答特性など他の分子特性の比較も進めたい。