

カラシン目魚類から見た赤緑型視物質遺伝子の重複と機能分化

平成17年度 修士学位論文

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 人類進化システム分野
46519 奥田 紘子

指導教官 河村 正二
平成18年1月31日提出

目次

I	序論	3
II	試料及び方法	
	II-1 試料	9
	II-2 方法	10
III	結果	23
IV	考察	26
V	謝辞	31
VI	参考文献	32
VII	図表	33
VIII	付記	46

I 序論

私達が日常を過ごしている世界は光と色に溢れている。動物はそれらの情報を利用して様々な識別を行っている。中でも色は、より詳細な情報を与えてくれる重要な要素である。例えば、サルは緑の葉の中から赤く熟した木の実を発見することが出来る。周りの色と同化して、捕食者から身を守っている昆虫がいる。このように、動物たちは、それぞれに色情報を活用している。

色は視覚の要素のひとつである。視覚は、太陽放射に由来する電磁波のうち可視領域である 400nm~700nm の波長を受容することで始まる。この光を受容するのが、動物の網膜中の視細胞で作られる視物質である。視物質は7回膜貫通型タンパク質のオプシンの内部に発色団である 11-*cis*-retinal、または 11-*cis* 3,4-dehydroretinal (ビタミンAのアルデヒド)が Schiff-base 結合した複合体である (Fig.1) (Palczewski et al., 2000)。これらのレチナールは光を吸収すると光エネルギーによって all trans 型へと異性化する。これが引き金となってオプシンに立体構造の変化が起こり、G タンパク質であるトランスデュシンを活性化させる。その後、セカンドメッセンジャーを介して光情報は増幅され、視細胞の膜電位を過分極させ、シナプスからの伝達物質放出量が低下する。この情報が、網膜中に存在する層状の細胞群に順次受け渡され、大脳皮質の視覚野まで伝達されて像が結ばれる (Shichida and Imai, 1998)。

脊椎動物の視細胞は、桿体細胞と錐体細胞の2つに大別される (Fig.2)。桿体細胞は薄明視に関与し、錐体細胞は明視や色覚に関与する。それぞれの外節には視物質が大量に存在しており、この視物質が最も吸収する光波長を最大吸収波長 (λ_{max}) と呼ぶ。桿体細胞には、ロドプシンとしてよく知られている桿体型オプシンが1種類、錐体細胞には λ_{max} が異なる4種類のオプシンが知られており、一般にそのうちの1つが1つの細胞で発現している。桿体型オプシンは、RH1 (λ_{max} =480-510nm)、

4種類の錐体型オプシンは、RH2 (RH1like, 緑型: $\lambda_{\max}=470-510\text{nm}$)、SWS1 (short wavelength sensitive 1, 紫外線型: $\lambda_{\max}=360-430\text{nm}$)、SWS2 (short wavelength sensitive 2, 青型: $\lambda_{\max}=440-460\text{nm}$)、M/LWS (middle to long wavelength sensitive, 赤緑型: $\lambda_{\max}=510-560\text{nm}$)である(Ebrey and Koutalos, 2001)。錐体におけるこれら4つの錐体オプシンが、それぞれ異なる波長の光を吸収することで色の識別ができるようになる。そしてそれらの異なる波長の光が区別されて脳内で情報処理されることにより、色覚が成立している。

色覚の進化は、様々な動物のオプシン遺伝子の分子系統学的解析により明らかにされてきた。脊椎動物のオプシンは、前述の5つのグループに分けられ、アミノ酸配列比較による分子進化学的解析によって系統関係が明らかにされており、M/LWSが最も起源が古く、ロドプシンであるRH1は錐体オプシン遺伝子から進化したことが支持されている(Fig.3) (Imai et al., 1997; Kuwayama et al., 2002; Okano et al., 1992)。一般に、桿体型オプシンのRH1は脊椎動物全てが持ち、魚類、両生類、爬虫類、鳥類は、色覚に関与する4つの錐体オプシン全てを持つ。これに対して、有胎盤哺乳類では一般的に錐体オプシンとして、M/LWSグループとSWS1グループにしか遺伝子を持たず、2色型色覚を示すものがほとんどである(Jacobs et al., 1993)。その中で霊長類では例外的にM/LWSグループに遺伝子重複が存在し(Dulai et al., 1999; Nei et al., 1997; Yokoyama and Radlwimmer, 2001)、両者が吸収波長の分化をすることで、いわゆる赤オプシン($\lambda_{\max}=560\text{nm}$)と緑オプシン($\lambda_{\max}=530\text{nm}$)を獲得した(Boissinot et al., 1998)。これまでの霊長類視物質の研究から、このM/LWSオプシンの λ_{\max} とオプシンのアミノ酸配列の関係が、厳密に明らかにされてきた。このM/LWSでは、5つのアミノ酸サイトのみで λ_{\max} の大部分が決定されることが明らかになっている。ヒトの赤オプシンのN末端から数えた場合、その5つのアミノ酸サイトは180、197、277、285、308番目にあたり、197番以外は全て膜貫通部分に存在する。これらの各サイト

がそれぞれ、A180S(180 番目のアミノ酸残基が、アラニン(A)からセリン(S)へと置換することを意味する)、Y197H、F277Y、A285T、S308A となるとき、 λ_{\max} はそれぞれ、7、28、8、15、16nm 長波長シフトする(Fig.4) 。これは“5サイトルール”と呼ばれている(Yokoyama and Radlwimmer, 1998)。霊長類では 197 番目と 308 番目のアミノ酸には変異が見られず、残りの3つのアミノ酸置換によってその λ_{\max} の多様性を説明することができる。これを特に3サイトルールと呼ぶ。

魚類は脊椎動物の中でも、高度な色覚を備えていることが知られている。これは、水中の光環境が、深度や濁度、有機物の溶解など、陸上にはない要因によって多様化しており、生息場所の環境に色覚を適応進化させてきた結果だと考えられている。前述の通り一般に魚類は、色覚に関与する4つのグループ全てにオプシン遺伝子を持つ。しかし魚類は、さらにグループ内に遺伝子重複によってサブタイプを形成している種が数多く存在している。例えば、ゼブラフィッシュは M/LWS グループに2つ、RH2 グループに4つのサブタイプを持つ(Chinen et al., 2003) 。さらにそれぞれのサブタイプ間で λ_{\max} が異なり、機能分化させている。中でも、霊長類と類似して、魚類には M/LWS グループに2つ以上のオプシン遺伝子を持つものが多く存在することはすでに知られている。

メキシカンテトラ(*Astyanax Mexicanas*) (分類は Fig.5 を参照)もその1つである。メキシカンテトラには同種内にメキシコの洞窟に生息する、眼球の退化した blind type と川に生息する通常の eyed type がある。Blind type は体色も失い、アルビノ化している。メキシカンテトラの M/LWS グループには R007、G101、G103 の3つのサブタイプがある(Yokoyama et al., 1993)。R007 の λ_{\max} は 560nm、G101 と G103 の λ_{\max} は 530nm であり、R007 は霊長類の赤オプシンに、G101 と G103 は霊長類の緑オプシンと、それぞれ λ_{\max} が対応している。R007 と G101/G103 の λ_{\max} は霊長類の赤及び緑オプシンと同様に3サイト(180、277、285)のアミノ酸置換によって分化していることがわか

っている(Dulai et al., 1999; Nei et al., 1997; Yokoyama and Radlwimmer, 2001)。この現象は、陸上の霊長類と水中の魚類が全く独立に同様の遺伝子重複とアミノ酸置換により、遺伝子を進化させてきたことを示しており、収斂進化の例として注目された(Fig6)。

G101、G103 の2つは、アミノ酸配列の類似性から比較的最近の遺伝子重複により生じたと考えられ、 λ_{max} も同じ値で互いに分化していないことから、ここではまとめてメキシカンテトラMWSと呼ぶことにする。また、R007をメキシカンテトラLWSと呼ぶ。遺伝子系統樹からメキシカンテトラのLWSとMWSを生み出したそもそもの遺伝子重複の起源は、硬骨魚類の共通祖先に遡るほど古いと推定される(Fig.7)。したがって、偽遺伝子化や遺伝子欠損が起こっていない限り、すべての硬骨魚類はメキシカンテトラと同様に、MWSとLWSの両方の遺伝子をもつと予想される。しかし、これまでに視物質が調べられてきた魚類では、MWSに相当する遺伝子はメキシカンテトラでしか発見されていない(Fig.7)。

M/LWSグループの魚類と霊長類の遺伝子の収斂進化は色覚の収斂進化を示唆している点で興味深い。しかし、魚類で発見された、この霊長類との収斂進化現象の色覚における意義は実は不明なことが多い。それらは次のことである。

- ① 魚類におけるMWS遺伝子の発現パターンが明らかにされていない。メキシカンテトラのMWSはLWSと共に網膜でcDNAが単離されているため、これらの遺伝子は網膜で発現していることが明らかとなっているが、細胞レベルでの特異的発現パターンは明らかではない。そのため、MWSは実際に視細胞で発現しているのか？またLWSと異なる細胞で発現しているのか、あるいは同じ細胞で発現しているのか？これらを現在のところ不明である。
- ② 異なる細胞で発現しているのであれば、視細胞からのシグナルは霊長類のように、LWSとMWSからのシグナルを比較するcolor opponencyのシステムを備え

ているのかどうかは全く未知である。

- ③ メキシカンテトラ以外にどのような魚類に MWS が存在するのか不明である。LWS が単離されている多くの魚種 (Fig.7 参照) で MWS が単に見落とされている可能性も否定はできない。しかし、ゲノム情報が入手可能であるフグ、ミドリフグ (*Tetraodon*)、ゼブラフィッシュ、メダカにおいては MWS が存在しないことが確認されている (Chinen et al., 2003; Matsumoto, 2006)。このことは、霊長類との収斂進化としてメキシカンテトラで発見された事象が多くの魚類にとっては重要ではない可能性を示唆している。その一方で、ある分類群の魚類には重要である可能性も示している。また、MWS がどのような魚種で保存されているかという情報の少なさゆえに、MWS の波長分化が進化の過程のいつ生じたのかが不明である。

①、②の点は、メキシカンテトラを研究対象としてさらに掘り下げていくことで解明することができる。しかし、残念ながら、日本国内でメキシカンテトラを入手することが困難である。③の問題に関しては、メキシカンテトラ以外の魚類を探索する必要がある。

そこで私は、メキシカンテトラと同じカラシン目カラシン科に属するカーディナルテトラ (*Paracheirodon Axelrodi*) (Fig.5) に着目した。カーディナルテトラはブラジル・ネグロ河に生息する淡水魚であり、その鮮やかな体色から観賞用熱帯魚として広く親しまれているため、日本国内でも容易に入手できる。またカーディナルテトラでは、これまでに視物質をはじめとした色覚が調べられた知見はない。これまでに視物質が調べられてきた種と比較して、カーディナルテトラは系統学上、最もメキシカンテトラに近縁であり、MWS を保持していることが期待される。もしカーディナルテトラから MWS に相当する遺伝子が発見されれば、①②の点の解明も将来的な視野に入れた上で、硬骨魚類全体のオプシン遺伝子の進化を分析する非常に有益な知見の1つになると期待される。

カーディナルテトラは、捕食者に発見されやすいにも関わらずその鮮やかな体色を維持しており、ストレスが掛かると体色を変化させているという報告もある。また、カーディナルテトラが生息するネグロ河には、*Paracheirodon* 属が他に2種(ネオンテトラ: *Paracheirodon innesi*、グリーンテトラ: *Paracheirodon simulans*) 存在し、体色が異なる。このことから、体色が何かしらのシグナルとなっていること、近縁種との区別を付けられるだけの色覚を有している、などの可能性が考えられる。このような背景から、カーディナルテトラはオプシンを調べる対象として非常に興味深い種であるといえる。

私はカーディナルテトラを用いて、

- ① 魚類における M/LWS グループのオプシン遺伝子、特に MWS がメキシカンテトラ以外の魚種に存在するかどうか
- ② MWS が存在した場合には、M/LWS グループにおける遺伝子重複と機能分化
- ③ 鮮やかな体色と色覚の関連性

という3つを本研究において検証する目的で、その第一歩として、カーディナルテトラのゲノムライブラリーから M/LWS 型オプシン遺伝子を、特に MWS に相当する遺伝子を単離とその初歩的な機能解析を行うことにした。

II-1 試料

カーディナルテトラは生息地がブラジルアマゾンのネグロ河流域で、採集及び繁殖も難しいことから、ペットショップで購入した。購入したカーディナルテトラは、水温 28°C、 $6 \times 10^{-3}\%$ 濃度の人工海水用塩 (Instant Ocean : Aquarium Systems) 中で、蛍光灯の点灯を 14 時間、消灯を 10 時間で切り替えた環境下で飼育した。餌はテトラミン(テトラベルケ社)、及びブラインシュリンプを与えた。

II-2 方法

II-2-1 ゲノム DNA 抽出

カーディナルテトラ一匹の whole body を以下の方法で抽出した。

- ① 氷殺後、液体窒素で凍結させた whole body を乳鉢ですりつぶし、15ml ファルコンチューブに回収する。
- ② 0.5M EDTA 500 $\mu\ell$, 10% SDS 500 $\mu\ell$, 10mg/ml Proteinase K 250 $\mu\ell$, ddH₂O 3750 $\mu\ell$ を加える。
- ③ 数回上下に振った後、65°Cで振とうさせながら一晩放置する。
- ④ 10分の1量の5M NaClと同量のフェノールを加え、室温で1時間ゆっくりと振とうする。
- ⑤ 3500rpmで15分間遠心する。
- ⑥ 上清を回収後、フェノール:クロロホルム 1:1を同量加え、④と同様に1時間振とうする。
- ⑦ 3500rpmで15分間遠心後、上清を透析チューブに移し、TE buffer (10mM Tris (pH8.0) / 1mM EDTA) 3l 中で一晩、4°Cで透析する。
- ⑧ 透析チューブから溶液を回収し、RNaseA (10mg/ml)を10 $\mu\ell$ 加え、37°Cで15分間反応させる。
- ⑨ 10分の1量の5M NaCl、フェノール:クロロホルム 1:1を同量加え、室温で1時間振とうする。
- ⑩ 3500rpmで10分間遠心後、上清を回収し12.5mlの2-propanolを加え、10000rpmで12分間遠心する。
- ⑪ 沈殿を70%エタノールでリンスし、乾燥する。
- ⑫ TE 200 $\mu\ell$ を加え、55°Cで一晩溶解する。
- ⑬ 0.5%アガロースゲル電気泳動で濃度を確認し、-80°Cで保存する。

II-2-2 ゲノムライブラリーの作成

- ① カーディナルテトラのゲノム DNA 30 μ g を Sau3AI で不完全消化させる。
- ② 0.5%アガロースゲル電気泳動により分離し、9–20kb の領域を回収、精製する。
- ③ 精製した DNA を Lambda EMBL3 vector kit (STRATAGENE) に組み込む。
- ④ MaxPlax Lambda Packaging Extracts (EPICENTRE) により、*in vitro* packaging を行い、titer が 8×10^5 plaque forming unit (pfu) 以上となるライブラリーを得た。

この titer は、カーディナルテトラがゼブラフィッシュと同程度のゲノム長を持つという仮定の下、カーディナルテトラの全ゲノムを含むのに十分な大きさである。

II-2-3 カーディナルテトラのオプシン遺伝子のゲノムライブラリースクリーニング

ゲノムライブラリーのスクリーニングには、プラークを移し取ったメンブレンに対して、DNA プローブをハイブリダイズさせて目的のクローンを単離する方法を用いた。

- ① 15mm の円形プレートに 1 枚あたり 1.0×10^5 pfu になるようにプラークを形成させる。
1 回のスクリーニングには、プレート 12 枚 (合計 1.0×10^5 pfu) を使用する。宿主細胞には、Spi 選択を可能にするため、P2 溶源菌である XL-1Bule MRA(P2) を使用する。
- ② プラークをナイロンメンブレン (BIODYNE A Membrane Rating : 0.45 μ m) に移し採る。
- ③ アルカリ変性処理 (0.5M NaOH/ 1.5M NaCl)、中和処理 (0.2M Tris(pH7.5)/2 \times SSC) を行った後、80°C で 30 分以上乾熱固定する。

プローブはゼブラフィッシュの LWS1 のエキソン1と2の領域を、cDNA をテンプレートに以下のプライマーを用いて PCR で増幅したものを使用する。

LW-ZF-EX1-FOR : 5' ATG GCA GAG CAT TGG GGA GA 3'

LW-ZF-EX6-REV : 5' TTA TGC AGG AGC CAC AGA AGA 3'

プローブのラベリング

- ① プローブ DNA 1 μ l、ランダムヘキサマー 1 μ l、ddH₂O 3.5 μ lをチューブに入れ、95°Cで5分間反応させた後、5分間氷上に置く。
- ② 10× TOYOBO Low Buffer 1 μ l、dNTPs mix (2.5mM each, -dCTP) 1 μ l、Klenow 0.5 μ l、 α -³²P-dCTP 2 μ lを加え、37°Cで2、3時間反応させる。
- ③ Bio-rad micro Bio-spin を用いて精製する。プレスピンを1000gで2分間遠心する。
- ④ ②の溶液にddH₂Oを40 μ l加え、スピнкаラムにアプライし、1000gで4分間遠心する。

ハイブリダイゼーションは、6×SSC/5×Denhardt's solution/0.1% SDS/ 10 μ g/ μ l E.coli DNA を用いて、55°Cで一晩行う。洗浄には1×SSC/0.1% SDSを用いて、55°Cで20分間を4回行った。洗浄が終わったメンブレンは、ラップに包み、-80°Cで露光させる。フィルムには、FUJI MEDICAL X-RAY FILM (FUJI FILM)を用いた。フィルムの現像はSRX-101 X-ray 自動現像機(Konica)を使用する。

II-2-4 ファージ DNA 抽出

以下の方法で、ファージ DNA の抽出を行った。

- ① ファージ溶液 5 μ lをXL-1 Blue MRA (P2) 培養液 2mlに加え、37°Cで15分間放置する。
- ② T-broth 200mlに入れ、溶菌するまで7~8時間37°Cで振とう培養する。
- ③ 溶菌後、20g ポリエチレングリコール#6000とNaCl 12gを加え、よく混合して氷中で

一晚放置する。

- ④ 3700rpm で 30 分間遠心する。
- ⑤ 上清を取り除き、500 μl の λ dilution buffer (10mM MgSO_4 /10mM Tris (pH7.4) /0.1mg/ml gelatin) を加え混合する。
- ⑥ 2ml チューブに移し、DNase I (10mg/ml) を 10 μl 加え、37°C で 30 分間反応させる。
- ⑦ 500 μl のクロロホルムを加え、混合し遠心する。
- ⑧ 上清を回収し、DNase I をさらに 10 μl 加え、37°C で 30 分間反応させる。
- ⑨ フェノールを 500 μl 加え混合した後、遠心する。
- ⑩ 上清を回収し、フェノール:クロロホルム 1:1 を 500 μl 加え混合した後、遠心する。
- ⑪ 上清を回収し、2-propanol を同量加え遠心する。
- ⑫ 沈殿を 70%エタノールでリンスし、乾燥する。
- ⑬ 500 μl の ddH₂O に溶解させ、RNaseA を 5 μl 加えて 37°C で 10 分間反応させる。
- ⑭ フェノール:クロロホルム 1:1 を 500 μl 加え、混合して遠心する。
- ⑮ 上清を回収後、0.7 倍量の 2-propanol を加え、軽く混合して析出物を沈殿させる。
- ⑯ 沈殿物を 70%エタノールでリンスし、乾燥する。
- ⑰ 200 μl の ddH₂O に溶解し、-20°C で保存する。

II-2-5 制限酵素地図の作成

- ① スクリーニングより得られた、 λ ファージクローンを BamHI, Bgl II, EcoRI, HindIII, KpnI, SacI, Sall, で制限酵素処理する。(37°C で 2 時間、single digestion または double digestion : 合計 28 通り)
- ② 0.5%アガロース電気泳動を行い、そのバンドパターンから、上記の酵素についての制限酵素地図を作成する。

- ③ 泳動した DNA はナイロンメンブレン (BIODYNE A Membrane Rating : 0.45 μm) にブロットニングする。
- ④ ハイブリダイゼーションにより、得られたシグナルパターンからエキソンの位置を推定する。

II-2-6 サブクローニング

λ クローンを制限酵素消化し、0.5%アガロースゲル電気泳動で分離した後、目的の DNA 断片を回収し、精製した。DNA の精製には、Ultra Clean 15 DNA Purification Kit (MO BI) を使用した。精製した DNA を Bluescript II SK(-) plasmid vector に組み込み、ヒートショックによりコンピテントセルに導入した。コンピテントセルは XL1-blue MRF' を用いた。目的の遺伝子を含むコロニーの選択には、アンピシリン耐性選択をブルーホワイト選択により行った。

II-2-7 プラスミド DNA 抽出

- ① 大腸菌培養液を 2ml チューブに回収し、遠心する。
- ② 沈殿物を 200 μl glucose-TE (0.8% glucose/25mM Tris(pH7.4)/10mM EDTA) に溶解する。
- ③ 400 μl (0.2M NaOH/1%SDS) を加え、混合し、氷上で 5 分間放置する。
- ④ 300 μl の 7.5M 酢酸アンモニウムを加え、混合し、氷上で 5 分間放置する。
- ⑤ フェノール: CIAA1:1 を 600 μl 加え、激しく混合し、遠心する。
- ⑥ 上精を回収後、同量の 2-propanol を加え、氷上で 10 分間放置し、遠心する。
- ⑦ 沈殿を 70%エタノールでリンスし、乾燥させる。

- ⑧ 沈殿物を 270 μl の ddH₂O, 30 μl の 5M NaCl と 1 μl の RNaseA を加え、37°C で 30 分間反応させる。
- ⑨ フェノール:CIAA1:1 を 300 μl 加え、激しく混合し、遠心する。
- ⑩ 750 μl のエタノールを加え、軽く混合した後、-80°C で 15 分間放置し、遠心する。
- ⑪ 沈殿を 70%エタノールでリンスし、乾燥させる。
- ⑫ 100 μl の ddH₂O に溶解し、-20°C で保存する

II-2-8 クローン DNA に対する nested deletion の導入

- ① 制限酵素消化により、サブクローン DNA の一端を 3'突出、もう一方を 5'突出または平滑末端にする。
- ② 2本鎖 DNA に特異的な 3'→5'エキソヌクレアーゼである exonuclease III を作用させることで、5'突出末端側から DNA を段階的に削った。削る DNA の長さは exonuclease III をいくつかの異なる時間で反応させて調節した。
- ③ Exonuclease III 処理後、mungbean nuclease を作用させて、1本鎖 DNA 部分を分解した。

II-2-9 塩基配列決定

塩基配列決定には、ABI PRISM Big Dye primer v3.0 を用いて反応させ、エタノール沈殿法による精製を行い、シーケンサーは、ABI PRISM R 3100-Avant Genetic Analyzer を用いた。

II-2-10 カーディナルテトラ視物質遺伝子のゲノムサザンハイブリダイゼーション

- ① 4 μg のカーディナルテトラゲノム DNA を制限酵素処理し、0.5%アガロースゲル電気泳動で分離する。
- ② アガロースゲルを VacuGene XL Vacuum Blotting System (Amarsham Pharmacia)を用いて、ナイロンメンブレン(BIODYNE B Membrane Rating:0.45 μm)にブロットイングする。
- ③ アルカリ変性処理(0.5M NaOH/1.5M NaCl)する。
- ④ メンブレンをペーパータオルにはさみ、80°Cで30分以上乾熱固定する。

プローブには、以下のプライマーを用いた PCR で増幅したカーディナルテトラ LWS のエクソン1と2を PCR により増幅したものを用いる。プローブの増幅のために用いられたプライマーを以下に記す。

LWS-f 5'-ATGGGCGACCAGTGGGGAGAC-3'

LWS-r 5'-CACAGGTAGCAACTGTATAGCC-3'

ハイブリダイゼーションは、6 \times SSC/5 \times Denhardt's solution/0.1% SDS/ 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ E.coli DNA を用いて、55°Cで一晩行う。洗浄には1 \times SSC/0.1% SDS を用いて、65°Cで20分間を4回行う。洗浄が終わったメンブレンは、ラップに包み、-80°Cで露光する。フィルムには、KODAK BioMax MS Film(KODAK)を用いる。フィルムの現像は SRX-101 X-ray 自動現像機(Konica)を使用する。

II-2-11 RNA 抽出

- ① 1 個体の両眼をピンセットでくり抜き、2.0ml チューブに入れる。
- ② 500 μl のセパゾール RNAi(nakarai)を加え、細胞がばらばらになるまでピペッティ

ングする。

- ③ 5 μl の酢酸と 500 μl のフェノール:CIAA=1:1 を加え、よくピペッティングした後、遠心する。
- ④ 上清を回収後、100 μl のクロロホルムを加え、室温で 3 分間反応させた後、遠心する。
- ⑤ 上清を回収後、16 μl の 3M 酢酸ナトリウム、3 μl のエタチンメイト(NIPPON GENE)、500 μl の 2-propanol を加えて、よくピペッティングした後、遠心する。
- ⑥ 沈殿物を 80%エタノールでリンスし、遠心する。
- ⑦ 沈殿物を乾燥させ、50 μl の RNA 用 H₂O を加え、よくピペッティングする。このとき、後の電気泳動のために 5 μl を保存しておく。
- ⑧ 10 μl の 10×DNase I Buffer、2 μl の DNase I (RNase Free TAKARA)と 43 μl の RNA 用 H₂O を加え、37°Cで 30 分間反応させる。
- ⑨ 1/2 倍量のフェノールと CIAA を加え、混合させた後、遠心する。
- ⑩ 上清を回収後、17 μl の 6M 酢酸アンモニウム(pH 5.2)と 125 μl の 100%エタノールを加え、-80°Cで 15 分間反応させる。
- ⑪ 遠心後、1mlの 80%エタノールでリンスし、よく乾燥させた後に、50 μl の RNA 用 H₂O に溶解させ、-80°Cで保存する。

II-2-12 カーディナルテトラ MWS の 3'RACE

カーディナルテトラ眼球 total RNA をテンプレートとして、oligo d(T)プライマー (5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CT(30)VN)のアダプター配列(5'-TCG AAT TCA AGC AGT GGC AAC AAC GCA GAG TAC-3')と、遺伝子特異的プライマーを用いて 3'RACE を行う。逆転写反応は 42°Cで 90 分間行い、PCR 反応は、[95°C10

秒、57°C10 秒、72°C60 秒]を 30 サイクルで行う。遺伝子特異的プライマーには、カーディナルテトラ MWS exon5 の部分配列(5'-GGT CCC CAG CAC ACG ACT ATA GCA ATG ATC ATC-3')配列を用いる。RT-PCR 産物はpBS II KS(-)プラスミドベクターにサブクローニングし、塩基配列決定を行う。

II-2-13 カーディナルテトラ眼球に対する in situ ハイブリダイゼーション

プローブの作製

カーディナルテトラ成魚の眼球から RNeasy (Qiagen)を用いて RNA を抽出し、SMART RACE Amplification Kit (clontech)と LWS,MWS の3'UTR 部分領域を含むオリゴプライマーを使用して RT-PCR を行い、取得した cDNA を pBluescript II (SK-)にサブクローニングする。使用したプライマーを以下に記す。

LWS3'UTRf 5'-AACACCAAGTTTACCTCACACCAC-3'

LWS3'UTRr 5'-CACAGTGAGTGTGAGTGTGAATCC-3'

MWS3'UTRf 5'-AAGTCTGTGCTGCCCTCTACTGCG-3'

MWS3'UTRr 5'-GTACCCGACAGGTGCAAAGAGAAG-3'

得られたサブクローンを BamHI で直鎖状にする。これをテンプレートとして DIG RNA labeling kit を用いて in vitro transcription(T7RNA ポリメラーゼを用いた)を行って、3'UTR RNA プローブを作製する。

精製した RNA プローブは、Micro Bio-spin 30 (Bio-Rad)を用いて精製する。

Eye cup の作成

- ① 個体を丸ごと氷水に入れる。
- ② 実体顕微鏡下で頭部を切断し、ピンセットで頭骸、顎等の組織を剥し、眼球のみを

摘出する。

- ③ 角膜にナイフで傷をつける。
- ④ 解剖用はさみを傷から入れて、角膜を瞳に沿って一周切り取る。
- ⑤ 1× Phosphate Buffer(PB)を眼球に少し垂らす。
- ⑥ 4% PFA(p-formaldehyde) in PB に入れて、4°Cで一晩固定する。

眼球の透徹

- ① 4% PFA(p-formaldehyde) in PB の眼球を 0.1M PB で 3 回洗浄する。
- ② 5% sucrose-PB (SPB) : 20% SPB = 1:0 に入れ、室温で 1 時間放置する。
- ③ 5% SPB : 20% SPB = 2:1 に移し、室温で 1 時間放置する。
- ④ 5% SPB : 20% SPB = 1:1 に移し、室温で 1 時間放置する。
- ⑤ 5% SPB : 20% SPB = 1:2 に移し、室温で 1 時間放置する。
- ⑥ 5% SPB : 20% SPB = 0:1 に移し、室温で 1 時間放置する。
- ⑦ 新しい 20% SPB に置き換えて、4°Cで一晩放置する。

眼球の包埋、凍結切片の作成

- ① 予め、OCT compound (Sakura Finetek) : 20% SPB = 1:1 をローテーターで混合しておく。

この間に透徹しておいた眼球を真ん中から半分に切断しておく。

- ② 眼球を包埋液(OCT : 20% SPB = 1:1)に入れて室温で1時間放置する。
- ③ 包埋液を満たしたクリオモルド(Sakura Finetek)に眼球を沈める。
- ④ クリオモルドを液体窒素中に入れ凍結させる。

凍結切片の作成

- ① ブロックをクライオスタットに置いて温度を -20°C に上げる。
- ② $10\ \mu\text{m}$ の厚さで切片を作成し、スライドガラスに貼り付けていく。

In situ ハイブリダイゼーション

- ① 切片を乗せたスライドガラスをドライヤーの冷風で約 30 分間乾燥させる。
- ② スライドガラスの周囲を PAP PEN (Daido Sangyo) でなぞり、ハイブリ溶液の土手を作成する。
- ③ 氷冷した 0.02M PBS で洗淨し、30 分間置く。
- ④ 0.02M PBS で洗淨、室温で 5 分放置するのを 2 回繰り返す。
- ⑤ $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase A $25\ \mu\text{l}$ を加え、 37°C で 5 分間放置する。
- ⑥ 氷冷した 4% PFA in PB に 20 分間入れる。
- ⑦ 0.02M PBS 中、室温で 5 分間放置する。
- ⑧ TEA (トリエタノールアミン) - a.a. 中、室温で 15 分間放置する。
- ⑨ 0.02M PBS 中、室温で 10 分間放置する。これを 2 回繰り返す。
- ⑩ プローブを RNase free の ddH_2O で最終濃度の 10 倍に希釈する。
- ⑪ これを 70°C で 10 分間加熱後、氷上に置く。
- ⑫ 湿箱を準備する。タッパーの中にペーパータオルを敷き、 50% ホルムアミド/ $2\times$ SSC で湿らせる。
- ⑬ スライドガラスの液滴をよく切ってから湿箱に並べ、1 枚あたり $200\ \mu\text{l}$ 程度のプローブ溶液をかけ、手早く Hybrislip (Grace Bio-Lab) でカバースリップする。
- ⑭ 湿箱を密封し、傾かないように平行に保ったまま 65°C で一晩放置する。

未反応プローブの洗淨

- ① 未反応プローブを洗う。50%ホルムアミド/2×SSC を染色壺に入れ、この中にスライドガラスを移し、65°Cで30分放置する。これを2回行う。
- ② 溶液を2×SSCに変え、65°Cで10分間放置する。
- ③ 溶液を0.5×SSCに変え、65°Cで20分間放置する。これを2回行う。
- ④ 溶液をMABTに変え、室温で10分間放置する。
- ⑤ 染色壺にBlocking溶液(2%blocking reagent(Roche) in MABT)を入れ、室温で30分放置する。
- ⑥ ddH₂Oを浸した湿箱に、スライドガラスを並べ、Blocking溶液に抗DIG抗体(Roche)を2000倍希釈したものをかけ、密封して室温で2時間放置する。
- ⑦ 染色壺にMABTを入れ、その中にスライドガラスを移し10分間放置する。これを5回繰り返す。
- ⑧ NTMでAPの活性化を行う。室温で20分間放置する。
- ⑨ NTMにNBT,BCIPをそれぞれ0.33mg/ml、0.16mg/mlになるように入れ、各スライドガラス上に500 μl程度乗せる。
- ⑩ 湿箱を遮光して発色反応を行う。
- ⑪ 発色が十分に見られたら、TEをスライドガラスにかけ、発色を停止する。

脱水・シグナルの透明化

- ① 湿箱内で、30%エタノールをかけ、室温で5分間放置する。
- ② 50%エタノールをかけ、室温で5分間放置する。
- ③ 70%エタノールをかけ、室温で5分間放置する。
- ④ 100%エタノールにつけこむ。
- ⑤ 100%キシレンにつけ、室温で1分間放置する。
- ⑥ 液滴をふき取り、完全に乾燥する。

- ⑦ 封入剤エンテランニュー(Merck)を上から数滴たらし、カバーガラスを乗せる。封入剤が完全に乾くまで重もりになるものを乗せておく。

Ⅲ 結果

カーディナルテトラのゲノムライブラリーのスクリーニング

カーディナルテトラのゲノムライブラリースクリーニングから、M/LWS グループのオプシン遺伝子 1 つを単離した。また、その塩基配列決定から、6 つのエキソンと5つのイントロンから構成されていること、スプライシングジャンクションシグナル(GT/AG)が全てのイントロンで保存されていることが明らかとなった(Fig.8-a)。これらの結果は、これまでに調べられた硬骨魚類のゲノム構造の特徴と一致していた。塩基配列に基づいた系統樹作成を行ったところ、この遺伝子はメキシカンテトラの R007 と最も近く、(93.2%の相同性)、MWS ではなく、LWS のサブグループに含まれることがわかった(Fig.9)。

メキシカンテトラの LWS と MWS の相同性は、R007 と G101 は 75.7%、R007 と G103 は 74.3%であることから、メキシカンテトラの LWS に orthologous であるゼブラフィッシュの LWS-1 では、スクリーニングにおいて MWS を十分にハイブリダイズできなかった可能性が考えられた。そこで、カーディナルテトラのゲノム DNA をテンプレートに、メキシカンテトラの G101 の配列から作製したプライマーを用いて PCR を行った。その結果、メキシカンテトラの MWS と非常に配列類似度が高い(95.8%)断片が得られた。その部分断片から未知の配列部分を決定するために、カーディナルテトラの眼球から得た total RNA を用いて RACE を行った。その 3'RACE から MWS のエキソン5、6、3'UTR を決定することができた。また、メキシカンテトラ G101 の配列を基に、カーディナルテトラのゲノム DNA をテンプレートにした PCR を行って、さらにイントロンを含め、エキソン2からエキソン5までの配列を決定した。しかし、5'RACE が成功しなかったことも含め、エキソン1の領域を単離することはできなかった(Fig.8-b)。

カーディナルテトラ M/LWS オプシン遺伝子のゲノムサザンハイブリダイゼーション

カーディナルテトラのゲノム中に、M/LWS グループのオプシン遺伝子がいくつあるかを検証するために、ゲノムサザンハイブリダイゼーションを行った。プローブには、カーディナルテトラ LWS のエキソン1からエキソン2までを用いた。用いた多くの制限酵素において、濃さの異なる2本のバンドを検出した。このことは、カーディナルテトラのゲノムに少なくとも2種類の M/LWS 型オプシン遺伝子が存在することを示している (Fig.10)。

遺伝子の進化系統樹

今回単離してきた M/LWS 型オプシン遺伝子に関して、遺伝子重複の時期や他の魚類オプシン遺伝子との系統関係を明らかにするために、M/LWS グループの進化系統樹を作成した (Fig.9)。系統樹作成には、LWS に関しては、全コード領域の塩基配列、MWS に関しては単離できなかったエキソン1を除く、コード領域の塩基配列を使用した。この系統樹のトポロジーはこれまでに知られている魚類の系統関係 (Nelson, 1994) と一致していた。この系統樹から、カーディナルテトラの LWS はゼブラフィッシュ、金魚、コイなどのクラスターから分岐した後に生じた、メキシカンテトラの LWS に最も近縁な遺伝子であることが示唆された。また、カーディナルテトラの MWS はメキシカンテトラの G103 とクラスタリングし、この遺伝子がメキシカンテトラの MWS と配列上最も近いことが示唆された。すなわち、この遺伝子がカーディナルテトラの MWS であることが示唆され、メキシカンテトラ以外でも MWS が魚類で存在することが初めて明らかとなった (Fig.9)。

In situ ハイブリダイゼーション

MWS エキソン5から行った 3'RACE で得られた MWS と LWS の 3'UTR 領域はそれぞれ 504bp、659bp であり、塩基配列の相同性が 40%未満であった。したがって、*In situ* ハイブリダイゼーションのプローブとして両者を区別する条件を満たすのでこの領域の一部を用いて、網膜切片に対して *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

MWS も LWS も発色反応を始めてから 30 分程度で発色が見られた (Fig.11)。シグナルは MWS、LWS 共に、網膜の錐体視細胞に背側から腹側にかけての全領域で検出された。また MWS、LWS 共に強いシグナルが見られたことから、網膜の錐体細胞で両方の遺伝子が発現していることを確認することが出来た。全体的にシグナルが見られるものの、MWS と LWS が同じ細胞で発現しているのか、異なる細胞で発現しているのかを判別することができなかつたため、two-color *in situ* ハイブリダイゼーションにより、詳細を検証する必要がある。

IV 考察

カーディナルテトラ M/LWS 型オプシン遺伝子の構造と重複

ライブラリースクリーニングで得られた LWS 遺伝子の構造は、その塩基配列決定から6つのエクソンと5つのイントロンで構成されていることが明らかとなった。この構造はこれまでに M/LWS グループの遺伝子が調べられてきた様々な硬骨魚類のエクソン-イントロン構造と一致していた。また、系統樹解析から、メキシカンテトラ R007 と高い boot strap 値(信頼値)(100%)でクラスターし、この遺伝子はゼブラフィッシュや金魚、コイなどとカラシン目魚類が分岐した後に、カラシン目が種分化したという形態による分類と一致しており、予想通りの結果であった。

またゲノムサザンハイブリダイゼーションでもう1つの M/LWS 型オプシン遺伝子の存在が示唆され、これがさらに未同定の MWS に相当するのか、あるいは LWS に相当するのか明らかにする必要がある。

M/LWS グループの吸収波長を特徴付ける5つアミノ酸サイト(180、197、277、285、308)の構成は、カーディナルテトラの LWS の場合、それぞれ、Ser、His、Tyr、Thr、Ala (Fig.12 および 14)であった。これはメキシカンテトラの R007 を含む多くの魚類の M/LWS グループのそれと一致しており(Fig.12)、 λ_{max} は約 560nm になると予測できる(Fig.14)。今後もし未同定の LWS のサブタイプがあるとして、それが単離されれば、他の魚類と同様に、サブタイプ間での発現量や発現パターンの違い、光吸収波長特性など、機能分化について検証していく必要がある。

また、ゲノム PCR で得られた部分断片の塩基配列とメキシカンテトラの G101、G103 の塩基配列との比較から、LWS 遺伝子と同様に、6つのエクソンと5つのイントロンから構成されていることがわかった。また部分配列から行った系統解析では、メキシカンテトラ G101、G103 と同じクラスターに入り、MWS に相当する遺伝子であることが示さ

れた。この結果は、本研究によって初めて、メキシカンテトラ以外の魚類で MWS が保持されていることを明らかにすることができた。

塩基配列決定から明らかになった吸収波長を特徴付ける5つのサイトは、180番と285番が緑型であった(Fig.13 および 14)。メキシカンテトラの G101 と G103 は共に、180番目、277番目、285番目の3サイトが緑型である。カーディナルテトラの λ_{max} 予測値は 538nm となり、メキシカンテトラの G101, G103 の 530nm からは 8nm のずれが生じる。G101 と G103 が共に180番、277番、285番の3つのアミノ酸サイトにおいて、緑型(短波長タイプ)であるのに対し、G103 とクラスターするカーディナルテトラの MWS が180番と285番のみ緑型であることは、カーディナルテトラにおいて、277番が赤型(長波長タイプ)に復帰したことを強く示唆している。このことは、カーディナルテトラが独自にメキシカンテトラとは異なる生息場所の環境に適応して進化してきた特徴である可能性も考えられ、非常に興味深い。

また系統樹解析で、今回単離してきたカーディナルテトラの MWS 断片が G101 ではなく、G103 とクラスターしていることにも着目したい。MWS を直接プローブにしたゲノムサザンハイブリダイゼーションが成功していないため推測の域を出ないが、カーディナルテトラ MWS にもメキシカンテトラと同様にサブタイプが存在し、今回部分的に単離してきたものと機能分化している可能性もある。これは、今後ライブラリースクリーニング等を行うことによって明らかにできると考えている。

MWS と LWS の機能分化

両遺伝子の光吸収波長特性に関わる5つのアミノ酸サイトから、MWS の λ_{\max} は 538nm、LWS が 560nm と予測された。このことから、遺伝子重複によってより多様な光を吸収できるように、二つの遺伝子を機能分化させてきたことが示唆されるだろう。

また、M/LWS 各視物質遺伝子の 3'UTR プローブを用いたカーディナルテトラの網膜凍結切片に対する *in situ* ハイブリダイゼーションから、MWS、LWS が共に網膜の錐体細胞で発現していることが明らかにされた。このことにより、LWS はもとより、MWS も機能して使われていることが強く示唆された。本研究で得られたカーディナルテトラの部分的な眼球凍結切片を見ると、背側から腹側に渡って全体的に MWS も LWS もシグナルが見られた。しかし、今回の実験からはヒトの LWS と MWS のようにカーディナルテトラでも、MWS と LWS が異なる細胞で発現しているのかどうかという点までは特定することは出来なかった。今後、完全な網膜凍結切片を得て、two-color *in situ* ハイブリダイゼーションにより二つの遺伝子の発現パターンを追及していくことで、MWS の発現様式を初めて報告する知見になりうると考えている。また、M/LWS グループにおけるサブタイプが見つければ、それらも合わせて解析していく必要がある。

今回、本研究によって魚類の MWS がメキシカンテトラ以外でも保存されていることが示されたのは重要な知見である。今後、カーディナルテトラ MWS の完全な単離、M/LWS グループにおけるサブタイプの検証を行い、硬骨魚類における系統関係を明らかにしていくことで、魚類の M/LWS 型オプシン遺伝子進化へ新たな知見を与えるだけでなく、霊長類との収斂進化を考える上でも非常に有益であると考えられる。

また、カーディナルテトラの大きな特徴のひとつに、その鮮やかな体色が挙げられる。よって、赤緑型以外のグループのオプシン遺伝子を探索し、その機能を解明していくことにより、体色の異なる同属種のネオンテトラやグリーンテトラといった種のオプシン遺伝子の比較を行うことが重要である。それらが明らかになれば、色覚と体色と

の関連性を考察することができるだろう。

V 謝辞

本研究を行うにあたり、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 人類進化システム分野の河村正二助教授には、的確なアドバイス、多大なご協力、常に熱心なご指導を賜りましたことを深く御礼申し上げます。また、同人類進化システム分野の太田博樹助手には、多大なご協力と、的確なアドバイスを賜りましたこと、深く御礼申し上げます。

実験機器を快く貸していただいた当専攻の細胞応答分野の皆様には、この場を借りて御礼申し上げます。

また、人類進化システム分野の笠木聡氏、武智正樹氏、松本圭史氏、には実験手順及び研究方針について、親切な指導と的確な助言をしていただきました。その他、よき相談相手となり、快適な環境を提供してくださった人類進化システム分野の皆様には、心より御礼申し上げます。

VII 参考文献

- Boissinot, S., Tan, Y., Shyue, S. K., Schneider, H., Sampaio, I., Neiswanger, K., Hewett-Emmett, D., and Li, W. H. (1998). Origins and antiquity of X-linked triallelic color vision systems in New World monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 13749–13754.
- Chinen, A., Hamaoka, T., Yamada, Y., and Kawamura, S. (2003). Gene duplication and spectral diversification of cone visual pigments of zebrafish. *Genetics* *163*, 663–675.
- Dulai, K. S., von Dornum, M., Mollon, J. D., and Hunt, D. M. (1999). The evolution of trichromatic color vision by opsin gene duplication in New World and Old World primates. *Genome Res* *9*, 629–638.
- Ebrey, T., and Koutalos, Y. (2001). Vertebrate photoreceptors. *Prog Retin Eye Res* *20*, 49–94.
- Imai, H., Kojima, D., Oura, T., Tachibanaki, S., Terakita, A., and Shichida, Y. (1997). Single amino acid residue as a functional determinant of rod and cone visual pigments. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 2322–2326.
- Jacobs, G. H., Deegan, J. F., 2nd, Neitz, J., Crognale, M. A., and Neitz, M. (1993). Photopigments and color vision in the nocturnal monkey, *Aotus*. *Vision Res* *33*, 1773–1783.
- Kuwayama, S., Imai, H., Hirano, T., Terakita, A., and Shichida, Y. (2002). Conserved proline residue at position 189 in cone visual pigments as a determinant of molecular properties different from rhodopsins. *Biochemistry* *41*, 15245–15252.
- Matsumoto, Y., Fukamachi, S., Mitani, H. and Kawamura, S. (2006). Functional characterization of visual opsin repertoire in Medaka (*Oryzias latipes*). *Gene in*

press.

- Nei, M., Zhang, J., and Yokoyama, S. (1997). Color vision of ancestral organisms of higher primates. *Mol Biol Evol* *14*, 611–618.
- 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 U S A* *89*, 5932–5936.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., *et al.* (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* *289*, 739–745.
- Shichida, Y., and Imai, H. (1998). Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals. *Cell Mol Life Sci* *54*, 1299–1315.
- Yokoyama, S., and Radlwimmer, F. B. (1998). The “five-sites” rule and the evolution of red and green color vision in mammals. *Mol Biol Evol* *15*, 560–567.
- Yokoyama, S., and Radlwimmer, F. B. (2001). The molecular genetics and evolution of red and green color vision in vertebrates. *Genetics* *158*, 1697–1710.
- Yokoyama, S., Starmer, W. T., and Yokoyama, R. (1993). Paralogous origin of the red- and green-sensitive visual pigment genes in vertebrates. *Mol Biol Evol* *10*, 527–538.

VII 図表

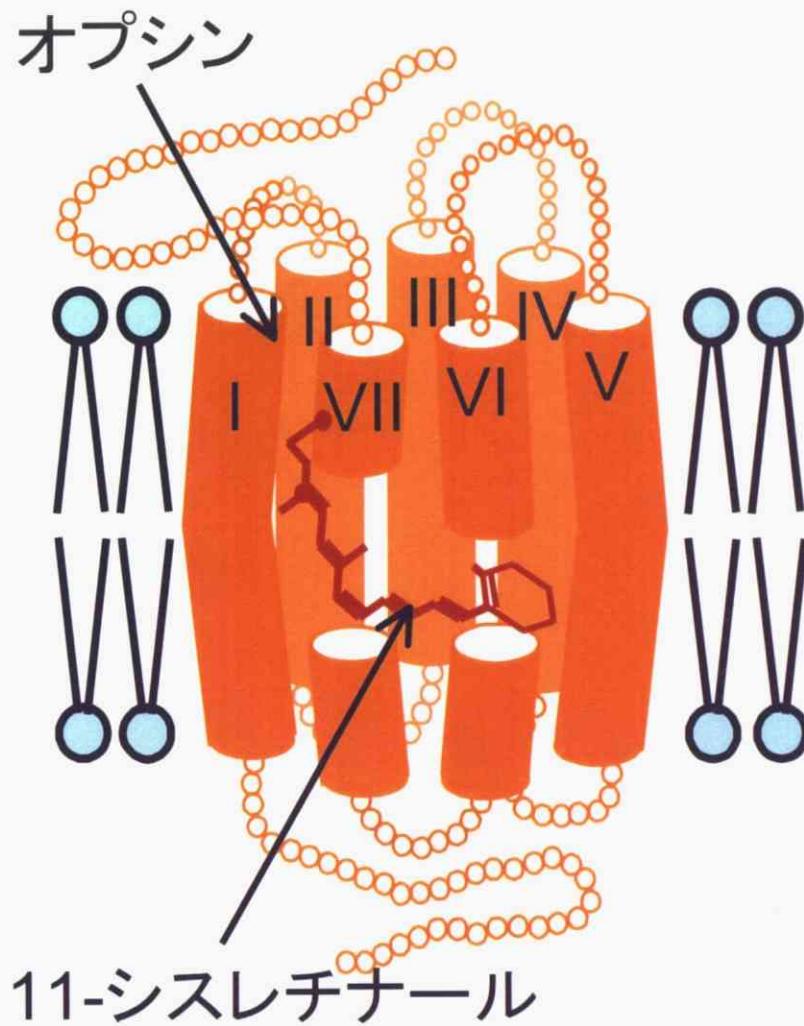


Fig.1 視物質の構造

視物質は、タンパク質であるオプシンとレチナール (11-*cis*-retinal 11-*cis*-3,4-dehydroretinal)から構成されている。オプシンは細胞膜を7回貫通しており、11-*cis*-retinalを取り囲むような構造をしている。

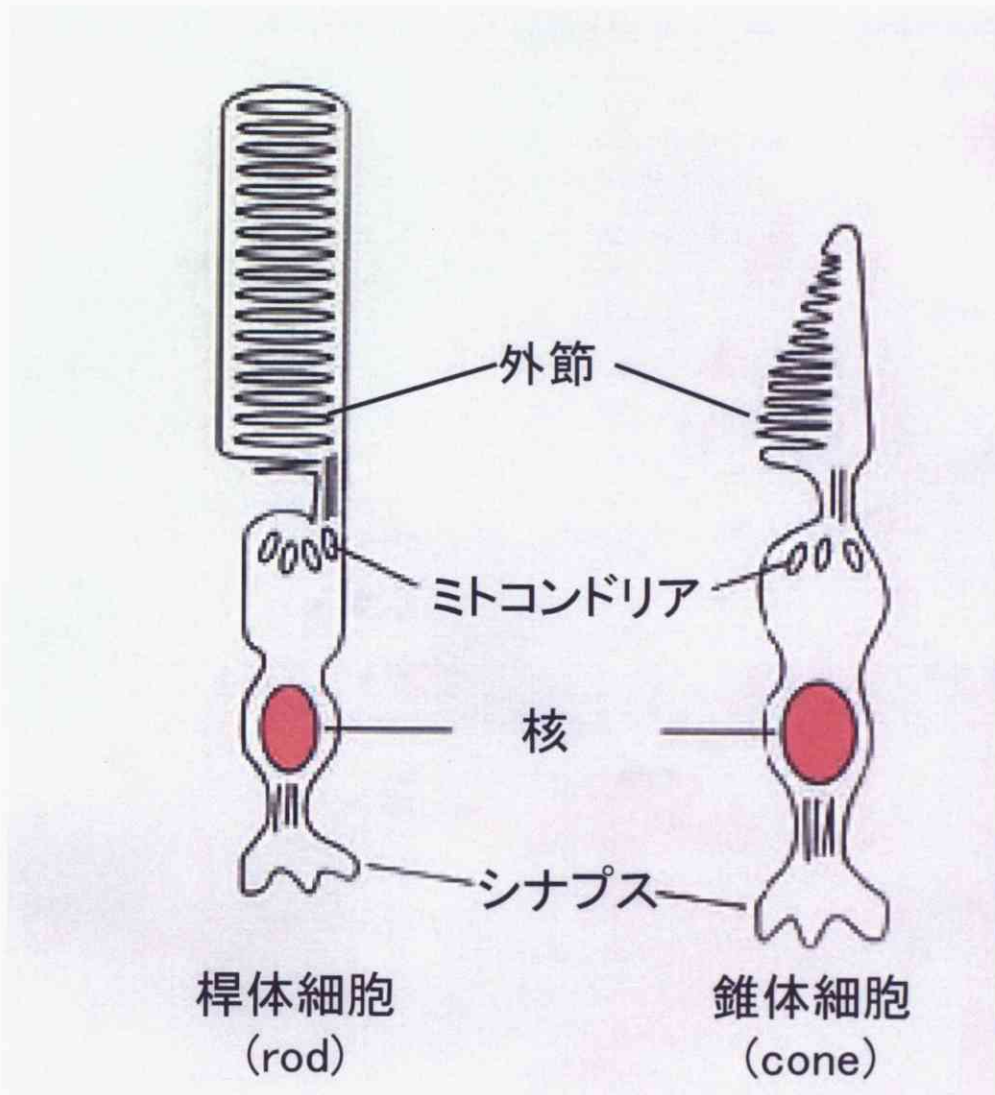


Fig.2 桿体細胞と錐体細胞の模式図

各外節には視物質が大量に存在している。

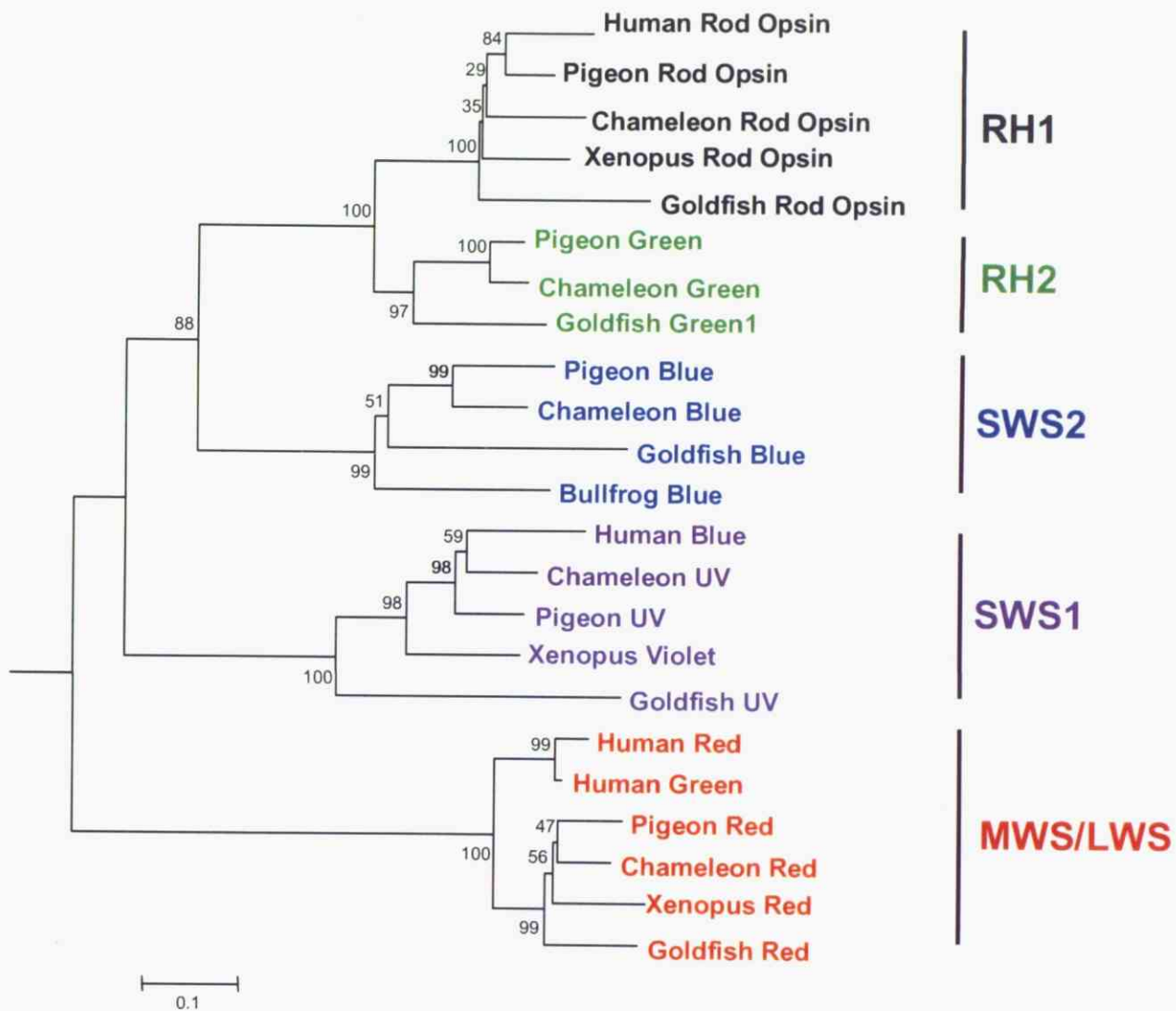


Fig.3 脊椎動物視物質遺伝子の進化系統樹

アミノ酸配列を基にNeighbor-joining法を用いて作成した。
系統樹内の数字はbootstrap valueを示す。

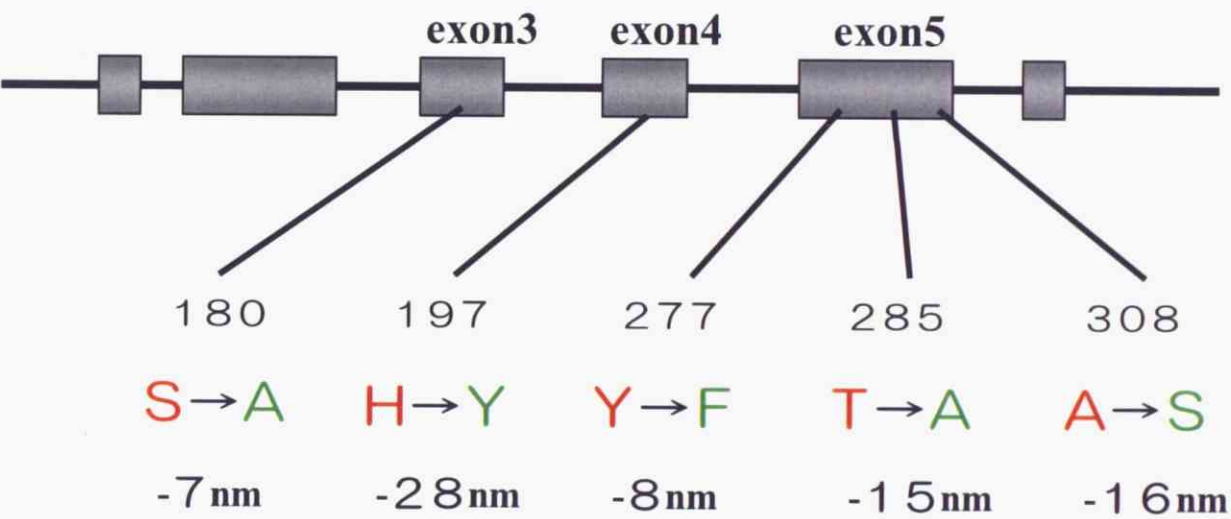
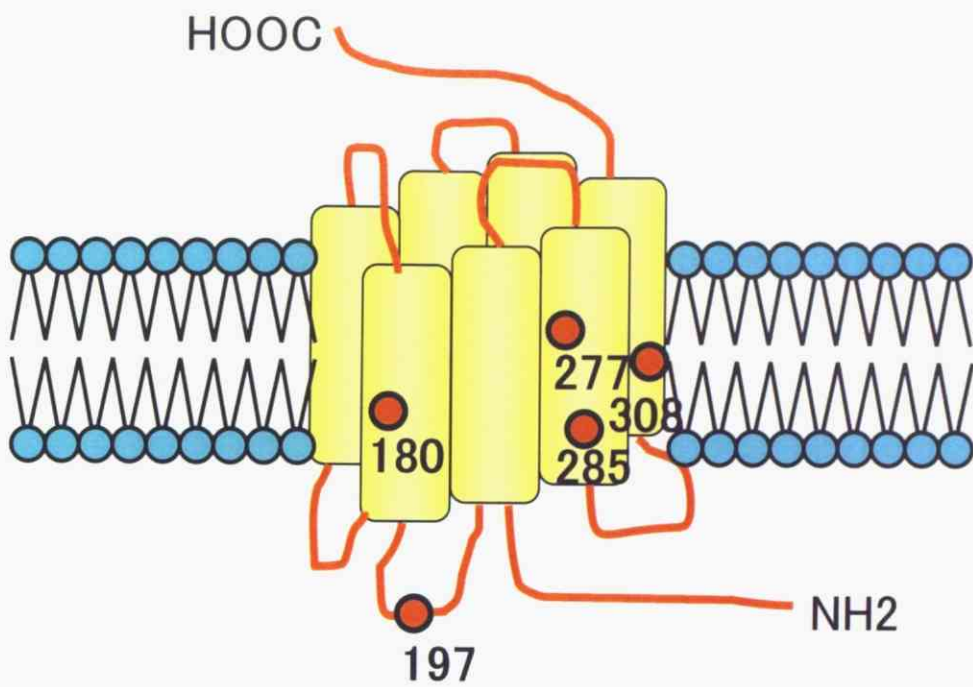


Fig.4 5サイトルールに関わるアミノ酸番号と位置

それぞれのアミノ酸が赤型から緑型に変異することにより
 λ_{max} は短波長シフトする。

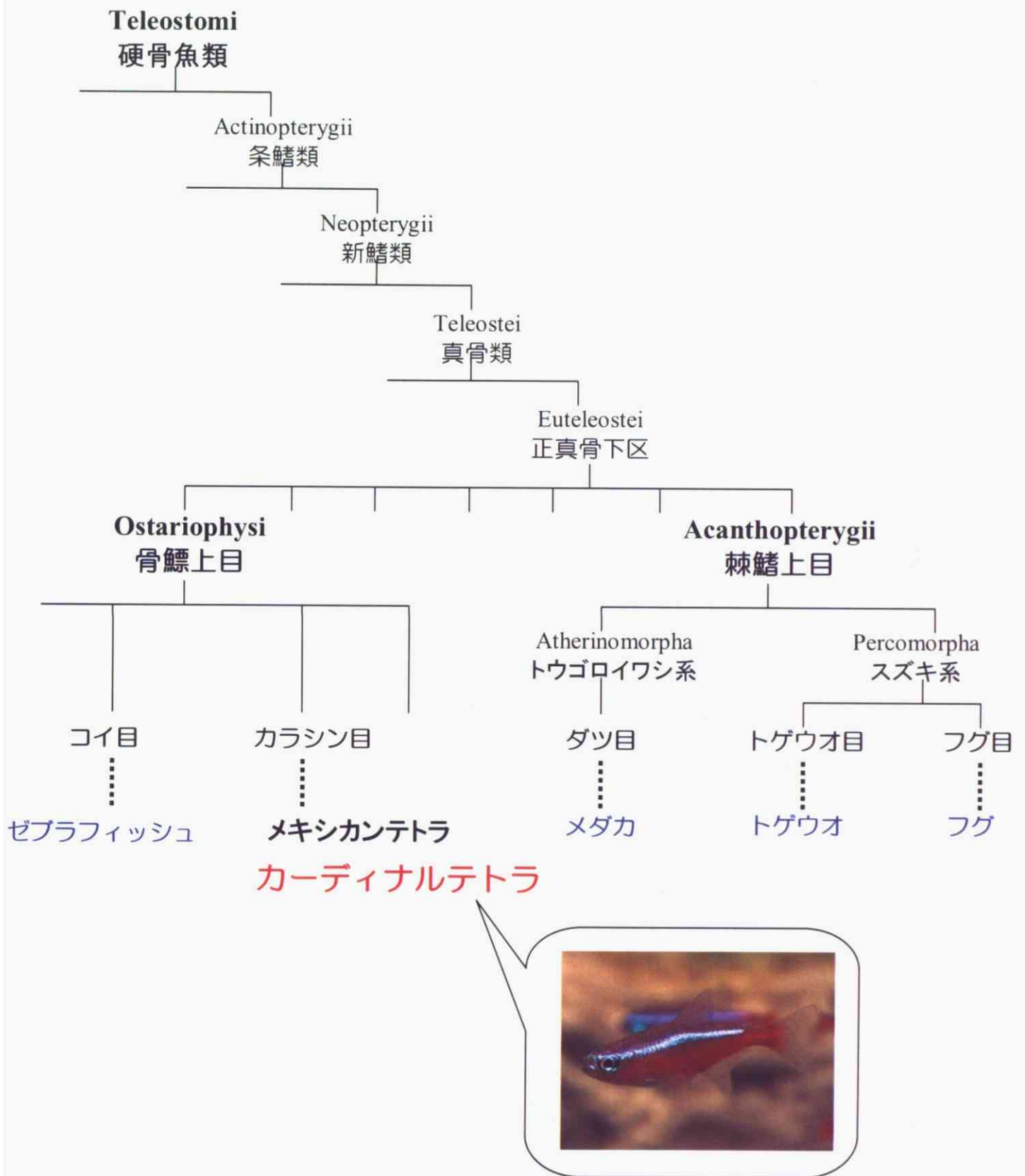


Fig.5 魚類の進化系統樹
形態によって分類されている。Nelson (1994)から引用

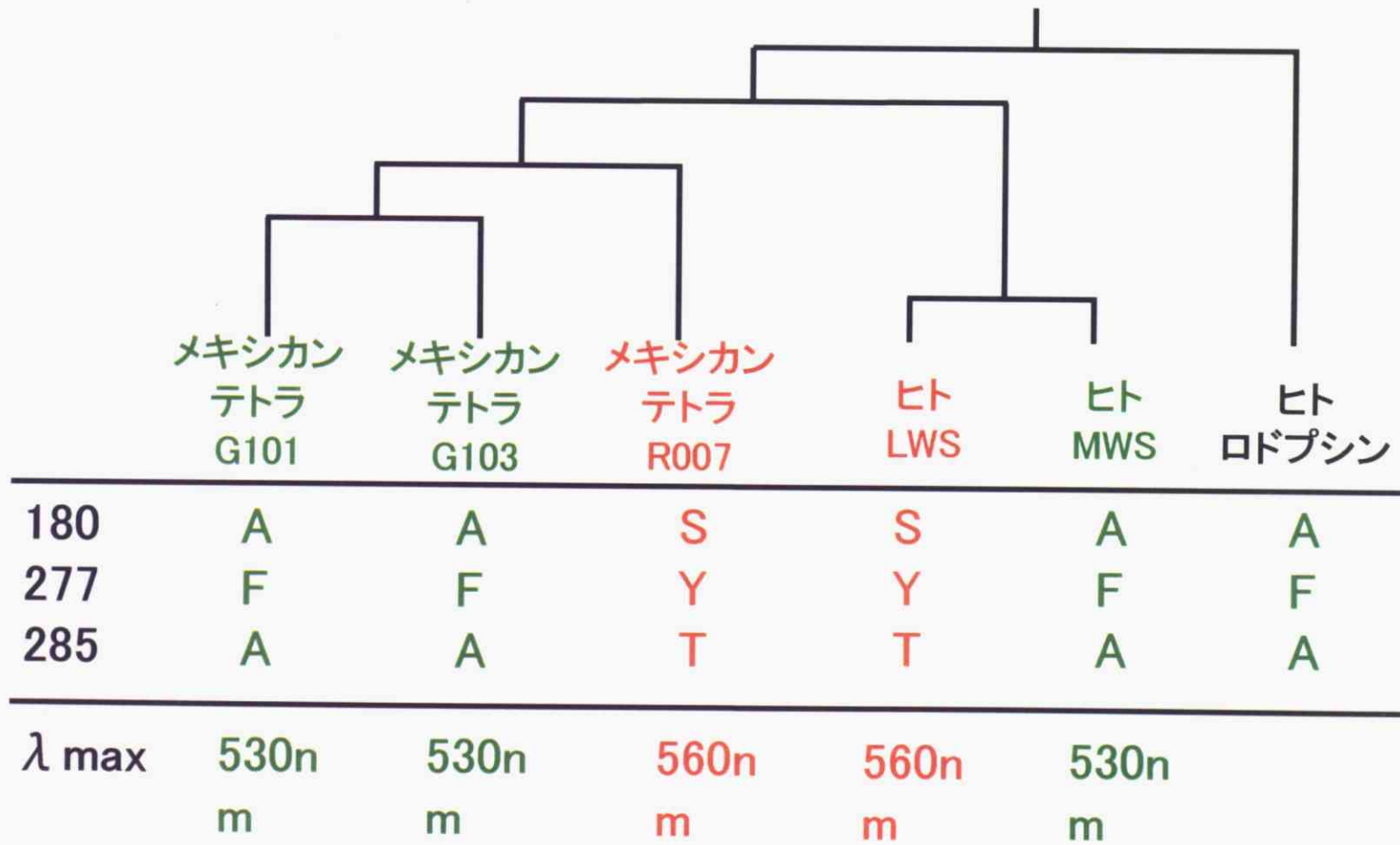


Fig.6 メキシカンテトラM/LWS型オプシン遺伝子とその3サイト、及び λ max
メキシカンテトラG101/G103は3サイト、 λ max共にヒトMWSに、R007はヒトLWSに対応している。

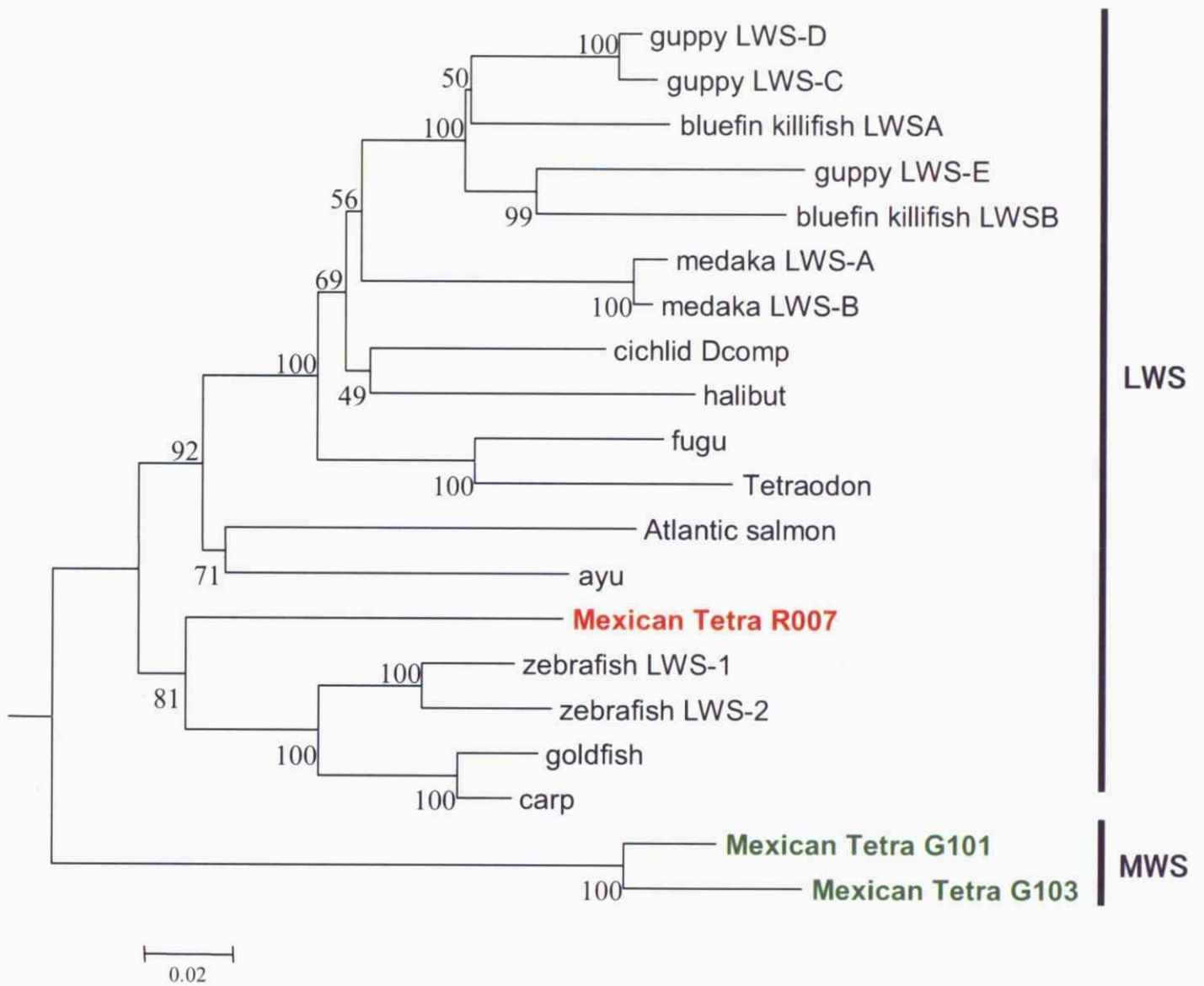


Fig.7 塩基配列による魚類のM/LWS視物質遺伝子の進化系統樹

塩基配列を基に、Neighbor-joining法を用いて作成した。枝上の数字はbootstrap value(信頼性を示す値)である。

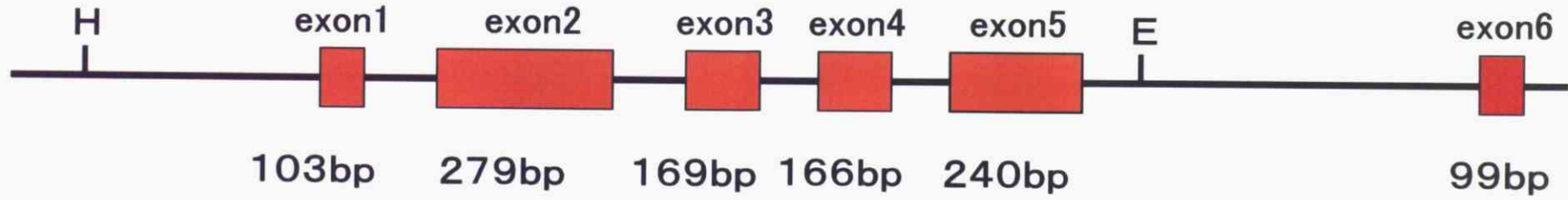


Fig.8-a ライブラリースクリーニングで単離した遺伝子の構造

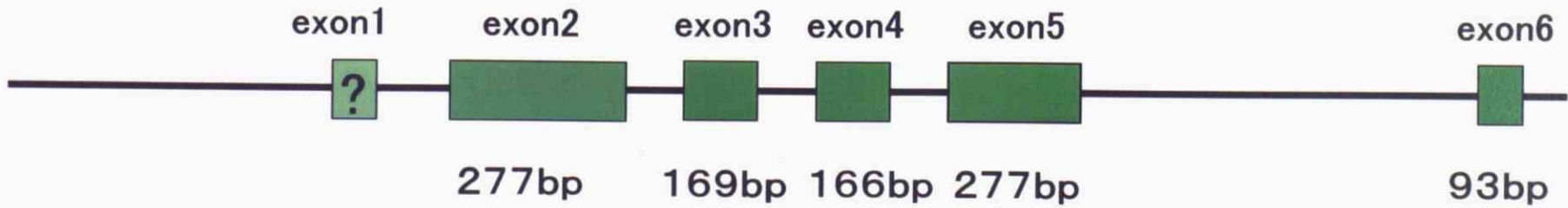


Fig.8-b ゲノムPCRとRACE法で単離した遺伝子の構造

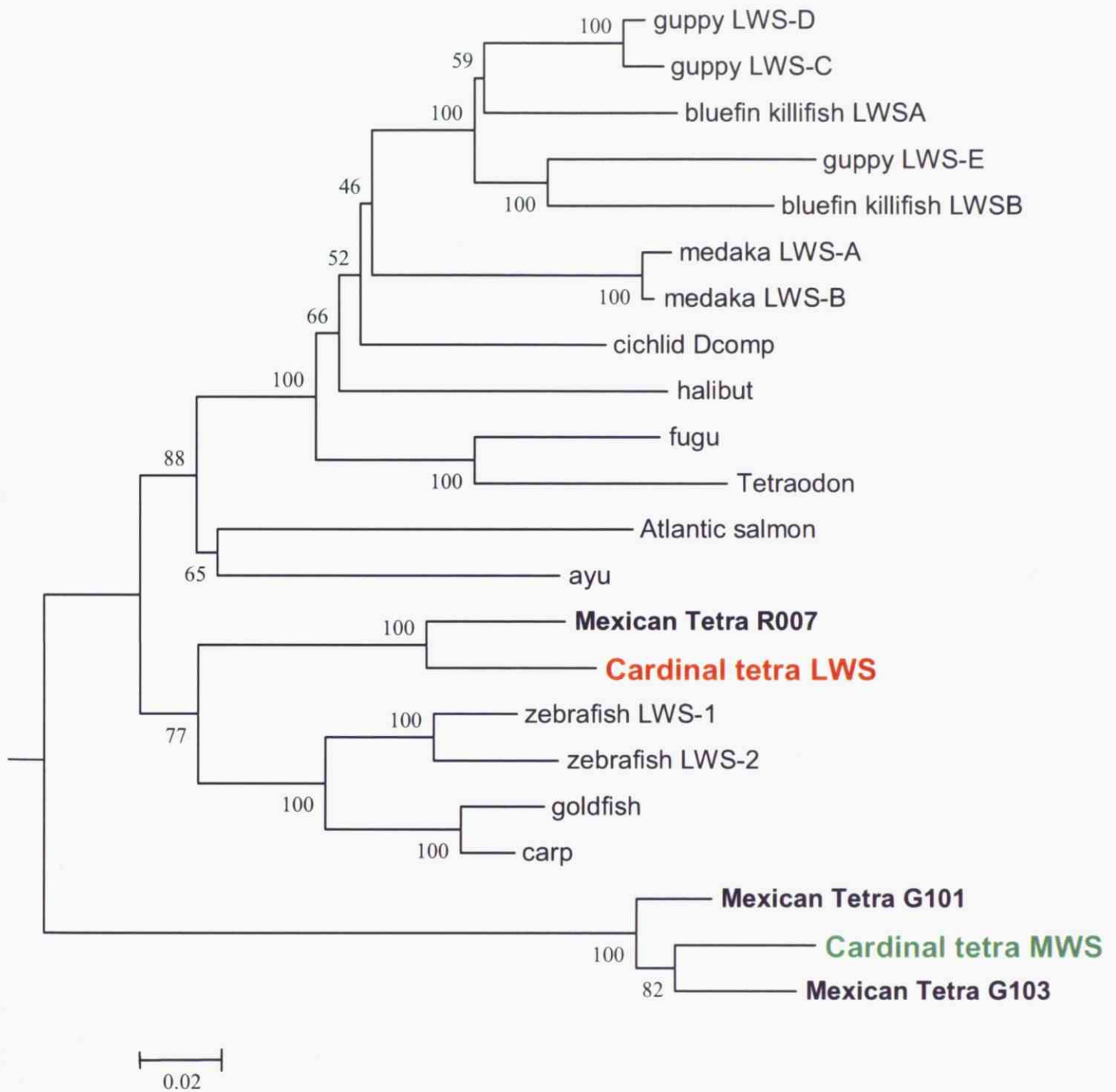


Fig.9 魚類のM/LWSの進化系統樹

塩基配列を基に、Neighbor-joining法を用いて作成した。
赤字はカーディナルテトラLWSを、緑字はカーディナルテトラ
MWSを示している。

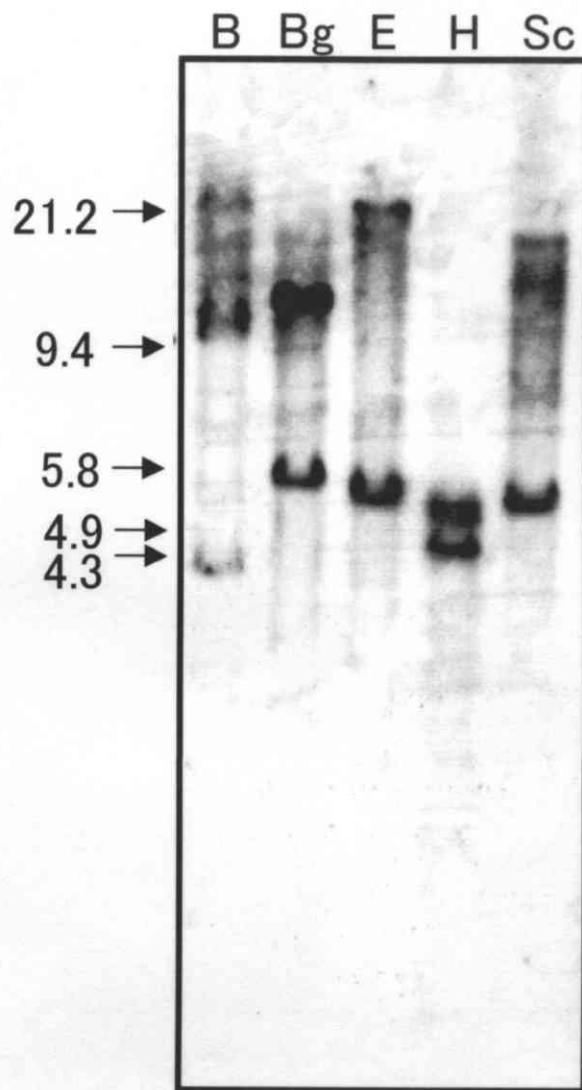
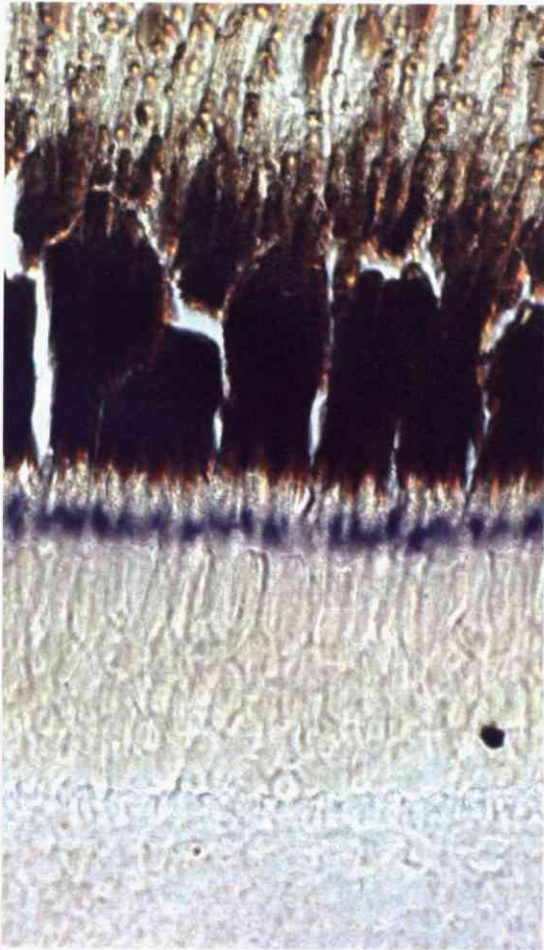


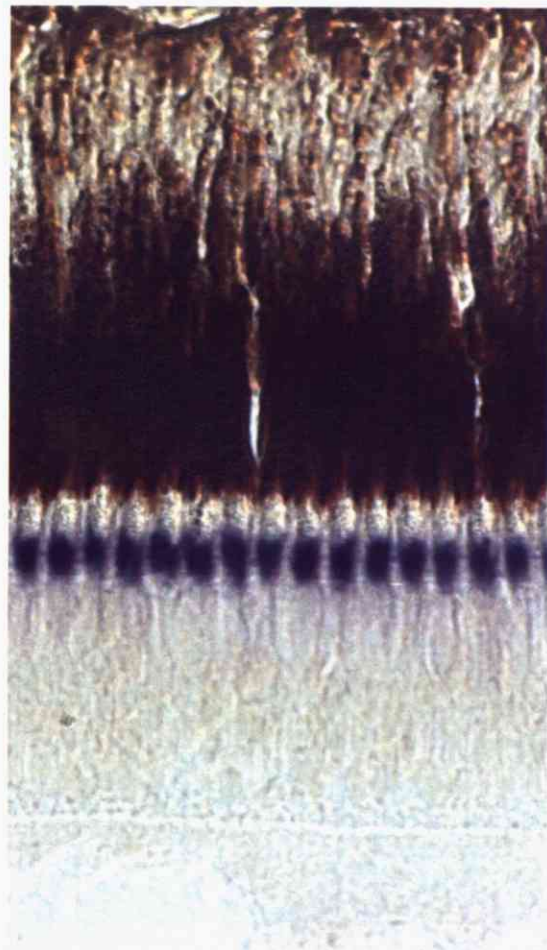
Fig.10 カーディナルテトラの赤型視物質の
ゲノムサザンハイブリダイゼーション

用いたプローブは上部に記している。

B: BamHI, Bg: Bgl II, E: EcoRI, H: HindIII, Sc: SacI



Probe : LWS 3'UTR



Probe : MWS 3'UTR

Fig.11 カーディナルテトラ網膜切片に対する*in situ* ハイブリダイゼーション

		I	
RHS	: MAQQWSLQRLAGRHPQDSYEDSTQSSIFTYTNSNSTRGPFEGPNYHIAPRWVYHLTSVWM		60
R007	: MGDQWGDVFAARRRG - - - DDTTREA AFTYTNSNNTKDPFEGPNYHIAPRWVYNLATCWM		57
LWS	: MGDQWGDVFAARRRG - - - DDTTREA AFVYTNSNNTKDPFEGPNYHIAPRWVYNLATLWM		57
	I	II	
RHS	: IFVVTASVFTNGLVLAATMKFKKLRHPLNWILVNLAVADLAETVIASTISIVNQVSGYFV		120
R007	: FFVVVASTVTNGLVLVASAKFKKLRHPLNWILVNLAIADLLETLLASTISVCNQFFGYFI		117
LWS	: FFVVVASTATNGLVLVATAKFKKLRHPLNWILVNLAVADLLETLLASTISVCNQFFGYFI		117
	III	IV	
RHS	: LGHPMCVLEGYTVSLCGITGLWSLAIISWERWLVVCKPFGNVRFDAKLAIIVGIAFSWIWS		180
R007	: LGHPMCVFEGFTVATCGIAGLWSLTVISWERWVVVCKPFGNVKFDGKMATAGIVFTWVWS		177
LWS	: LGHPMCVFEGYTVATCGIAGLWSLTVISWERWVVVCKPFGNVKFDGKMAIAGVLFTWVWS		177
	IV	V	
RHS	: AVWTAPP IFGWSRYWPHGLKTSCGPDVFSGSSYPGVQSYMIVLMVTCCIIPLAIIMLCYL		240
R007	: AVWCAPP IFGWSRYWPHGLKTSCGPDVFSGSEDPGVQSYMIVLMITCCFIPLGIIILCYI		237
LWS	: AFWCSPPIFGWSRYWPHGLKTSCGPDVFSGSEDPGVQSYMIVLMITCCFIPLAIIILCYL		237
	VI		
RHS	: QVWLAI RAVAKQQKESESTQKAEKEVTRMVVVMIFAYCVCWGPY TFFACFAAANPGYAFH		300
R007	: AVWWAIR TVAQQQKDSESTQKAEKEVSRMVVVMIMAYCFCWGPY TFFACFAAANPGYAFH		297
LWS	: AVWWAIR TVAQQQKDSESTQKAEKEVSRMVVVMILAYCFCWGPY TFFACFAAANPGYAFH		297
	VII		
RHS	: PLMAALP AYFAKSATIYNPVIYVFMNRQFRNCILQLFGKKVDDGSELSSASKTEVSSVSS		360
R007	: PLAAAMP AYFAKSATIYNPVIYVFMNRQFRVCIMQLFGKKVDDGSEV-STSKTEVSSV--		354
LWS	: PLAAAMP AYFAKSATIYNPVIYVFMNRQFRVCIMQLFGKKVDDGSEV-STSKTEVSSV--		354
RHS	: VSPA		364
R007	: -APA		357
LWS	: -APA		357

Fig.12 カーディナルテトラのLWS視物質遺伝子から推定されるアミノ酸配列
およびHuman Red (RHS)、メキシカンテトラR007との比較

7回膜貫通領域は上部の線によって示し、ローマ数字は何番目の貫通領域かを示している。色が付いている塩基配列は5サイトルールに参与するアミノ酸である。LWSは5つのサイト全てが赤型であった。

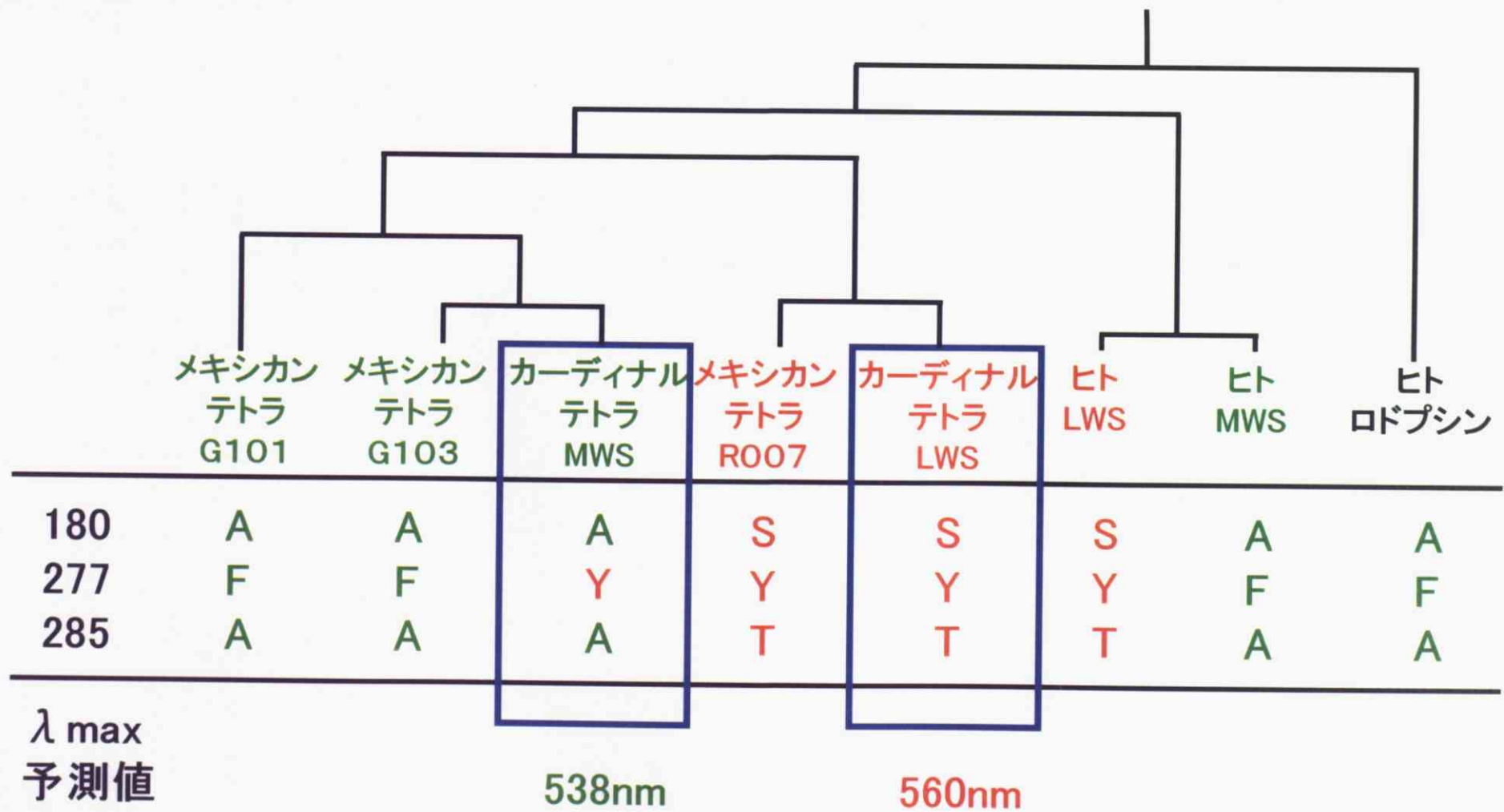


Fig.14 LWSおよびMWSの5サイトと各オプシンの λ max予測値

LWSの5サイトは全て赤型、MWSの5サイトは180番目と285番目の2つが緑型である。

VIII 付記

本文中に記載のない試薬の組成

① 20 × SSC(1L) : store at RT

NaCl	175.3g
Na Citrate	88.2g
ddH ₂ O	up to 1L

② 100 × Denhardt's solution (500ml) : store at -20°C

Ficol400	10g
Polyvinyl pyrrolidone	10g
Bovine serum albumin	10g
ddH ₂ O	up to 500ml

③ CIAA(25ml) : store at 4°C

Chloroform	24ml
Isoamyl Alcohol	1ml

④ TE(100ml) : store at RT after autoclaved

1M Tris (pH8.0)	0.5ml
0.5M EDTA (pH8.0)	200ml
ddH ₂ O	up to 100ml

⑤ 0.1M Phosphate Buffer (PB)

0.5M Na ₂ HPO ₄	160ml
0.5M NaH ₂ PO ₄	40ml
ddH ₂ O	up to 1L

⑥ 0.1M PBS

NaCl	75g
Na ₂ HPO ₄	24.81g
NaH ₂ PO ₄	2.8g
ddH ₂ O	up to 1L

⑦ TEA-a. a.

0.1M TEA (Triethanolamin) pH8.0

0.25% Acetic anhydride

⑧ MABT (1L) : store at RT

0.1M Maleic Acid	11.6g
0.1M NaCl	8.76g
0.1% TritonX-10	1ml
H ₂ O	up to 1L

⑨ Hybridization Buffer : store at -20 °C

Formamide	50%
SSC pH4.5	1 ×
Heparin Na	50 µg/ml
RNA from Yeast	500 µg/ml
(Yeast RNA (Sigma) torura ribonucleic acid R-3629)	
Tritonx-10	0.1%
EDTA (pH8.0)	1mM

⑩NTM

100mM NaCl

100mM Tris (pH9.8)

50mM MgCl₂