

論文の内容の要旨

論文題目 カレイ目視覚オプシンの分子進化学的研究

氏名 笠木 聡

【背景】

近年、カレイ目の魚種であるマツカワ (*Verasper moseri*) に発光ダイオード (LED) を照明として用いた特定波長光照射飼育実験を行った結果、緑色光の照射により成長が亢進することが判明した (発表論文 2, 4)。よって、緑色 LED 光に含まれる特定の波長成分がマツカワの生理的状态を変化させ成長を促した可能性が示唆された。光波長の違いが生理的状态に明確な影響を与えた知見は少ない。光波長の差が生理的機能の変化を生み出すことから、色覚のような波長の違いを弁別可能な光受容系の関与が示唆された。

視覚は網膜の視細胞によって光が受容されることに端を発する。視細胞の外節膜に存在し光受容を担う分子が視物質である。視物質は吸光団であるレチナールとオプシントタンパク質から構成される。視細胞には錐体と桿体があり、明るい環境で色覚的視覚機能を担うのが錐体である。1つの錐体には基本的に1種類のオプシントタンパク質しか発現しないため、オプシンの種類が錐体の種類に対応する。何種類のオプシンを持ち合わせているかは生物種によって大きく異なる。脊椎動物においては錐体オプシン LWS (赤型)、RH2 (緑型)、SWS2 (青型)、SWS1 (紫外線型) および桿体オプシン RH1 が存在する。

脊椎動物の中でも硬骨魚類の色覚は種間の差が大きいことが分かってきた。多くの魚類は固有のオプシンレパートリーを持つ。種特異的な色覚型の違いは、種々の生物が進化の過程でそれぞれの生息環境に適応した結果だと考えられている。

このように種間で多様性に富むオプシンの遺伝子レパートリーおよび機能について、カレイ目の魚種における知見は少ない。そこで本研究では、①カレイ目魚種であるマツカワの視覚オプシン単離及び機能解析、②カレイ目魚種間での視覚オプシンの比較による分子進化解析、③マツカワにおける非視覚オプシン群の単離および機能解析により、カレイ目の視覚・非視覚オプシンについての検討を行った。

【第一章：マツカワ視覚オプシンの単離および機能解析】

マツカワの成長を亢進する特定波長光の受容機構を探る端緒とするため、マツカワの眼球に発現する視覚オプシンの探索を行いその機能を解析した (発表論文 1)。

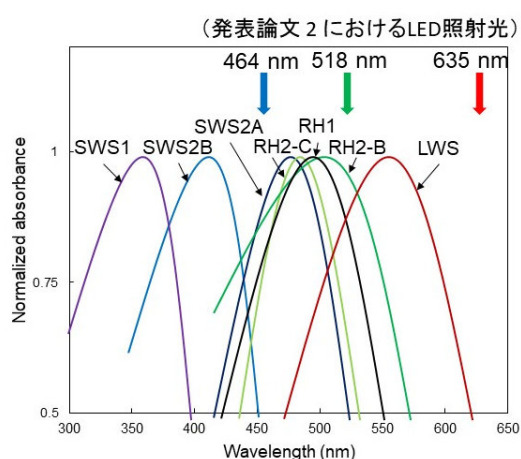
マツカワ視覚オプシンの cDNA クローニングの結果、脊椎動物視覚オプシンである LWS (赤型)、RH2 (緑型)、SWS2 (青型)、SWS1 (紫外線型) および RH1 (薄明視型) の5つ全てがマツカワ眼球から単離された。RH2 は3つのサブタイプ (RH2-A、RH2-B および RH2-C) に分化し、SWS2 は2つのサブタイプ (SWS2A および SWS2B) に分化していた。マツカワと同じく棘鰭上目魚であるメダカやシクリッドとの比較の結果、これらのサブタイプ化は棘鰭上目の祖先における遺伝子重複に由来す

と考えられた。ただしマツカワ RH2-A はゲノム DNA 中に存在は確認されたものの眼球において mRNA の発現は確認されず、またナンセンス変異により偽遺伝子化していた。

眼球において発現が確認された 7 オプシン遺伝子について、視物質再構成による最大吸収波長 (λ_{\max}) の測定を行った。多くのオプシンは棘鰭上目魚種として妥当な値の λ_{\max} を示した一方で、SWS2A は 482 nm と、一般的な棘鰭上目魚の SWS2A (λ_{\max} : 430-460 nm 程度) に比べて長波長感受性を示した。

上記 7 オプシンについて、3 ヶ月、15 ヶ月および 27 ヶ月齢のマツカワ眼球における mRNA 発現量を定量的 RT-PCR によって測定した。その結果、RH2-B および SWS2A の発現量は成長を通じて変動せず、RH1 の発現量が増加することが明らかになった。これら以外の 4 オプシン遺伝子は発現量が減少した。

マツカワでは RH2-A の偽遺伝子化により緑色光感受性のオプシンが減少した。一方で SWS2A の



長波長化により緑色光感受性のオプシンが増加した。また緑色光感受性である SWS2A および RH2-B の発現量は成長とともに変化しなかった。マツカワにおいて成長促進効果を示した特定波長光 (緑色 LED 光 : 518 nm) は、成長とともに発現量が減少しない RH2-B (λ_{\max} : 506 nm) と SWS2A (482 nm) オプシンにより十分受容される。よって、緑色光感受性視覚オプシンが、マツカワの緑色光照射による成長促進効果と関連する可能性が示唆された。

【第二章：カレイ目魚類における視覚オプシンの分子進化解析】

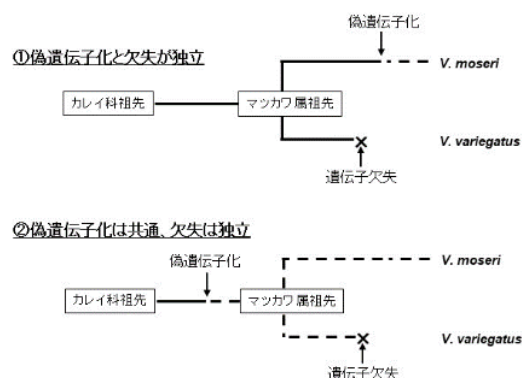
筆者らはカレイ目に属するホシガレイ (*V. variegatus*) とヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) においてマツカワと同様に緑色光照射により成長が促進すると報告した (発表論文 5)。カレイ目において広く緑色光照射による成長促進が認められることから、カレイの生活史と色覚機能との間に関連があり、それが成長促進につながるのではないかと考えた。そこで、カレイ目の中では深海に生息するババガレイ (*Microstomus achne*) を含めて、異なる光環境と色覚機能との関連を検討した (発表論文 3)。

視覚オプシンレパートリーを比較した結果、4 種のカレイにおいて基本的な遺伝子構成は類似していた。ババガレイおよびヒラメの RH2-A オプシンはゲノム DNA 上に存在することが確認され、かつマツカワのように偽遺伝子化している兆候は認められなかったにも関わらず、眼球での発現が認められなかった。ホシガレイの RH2-A は存在が確認されなかった。ホシガレイおよびヒラメの RH2-C は眼球での発現が確認されたが、ババガレイの RH2-C はゲノム DNA 中に存在が認められなかった。

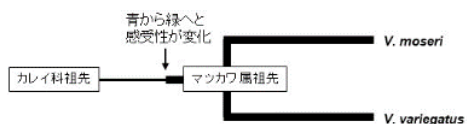
演繹アミノ酸配列を比較した結果、SWS2A の波長調節アミノ酸サイトには種間での差異が認められた。そこでホシガレイ、ババガレイおよびヒラメの SWS2A オプシン λ_{\max} を視物質再構成により測定したところ、マツカワ属 (マツカワおよびホシガレイ) SWS2A の λ_{\max} は 480 nm 以上であり長波長

感受性であったが、ババガレイおよびヒラメ SWS2A の λ_{\max} は各々460 nm 程度と一般的な値を示した。このマツカワ属 SWS2A 長波長感受性化の原因を探るために、カレイ目祖先およびカレイ科祖先の SWS2A アミノ酸配列を推定し、点変異導入によって cDNA 配列を作出した後に再構成によって λ_{\max} を測定した。その結果、カレイ科祖先からマツカワ属祖先にいたる系統において長波長化が起こり、その系統間で起こった 8 つのアミノ酸変異に長波長化の原因があると考えられた。8 変異のうち、Ala 275 Thr 変異はレチナール近傍に側鎖が位置し波長調節アミノ酸サイトとしても知られている変異であった。そこでこの変異の効果を検討したところ、マツカワ属 SWS2A 長波長化の大部分(+20 nm 中の 17 nm)を担うことが判明した。

A: RH2-A



B: SWS2A



以上から、カレイ目全般において RH2-A および RH2-C のバリエーションに種差があること、マツカワ属の SWS2A が長波長化していることが分かった。マツカワ属においては RH2-A が偽遺伝子化（マツカワ）または消失（ホシガレイ）していることを踏まえると、SWS2A の長波長化と RH2-A の偽遺伝子化または消失は近いタイミングで起きたイベントと推測され、マツカワ属系統においては緑色光受容を担うオプシンが遺伝子間で切り替わったことが示唆された。

【第三章：マツカワにおける非視覚オプシンの単離と発現組織の検討】

第一および第二章ではマツカワを中心としてカレイ目視覚オプシンの単離および機能解析を行い、緑色感受性オプシンについて分子進化学的考察を行ってきた。一般に脊椎動物には視覚以外の光受容機能が備わっており、例えば生物時計、体色調節、初期発生などに関与することが知られている。これら非視覚的光受容を担う非視覚オプシンが特定波長光照射による成長促進に関与している可能性があるため、マツカワにおける非視覚オプシンの探索と発現解析を行った。また、一部の非視覚オプシンについては λ_{\max} を測定し、緑色光照射との関連を考察した。

マツカワ仔魚全身由来の total RNA を用い、一般的に脊椎動物がもつと考えられる非視覚オプシンの cDNA クローニングを行った。その結果、エクソロドプシン、VAL オプシン、パラピノプシン、パリエトプシン、TMT オプシン、エンセファロプシン (Opn3)、メラノプシン (Opn4)、ニューロプシン (Opn5) の cDNA 配列を得た。パラピノプシンおよびメラノプシンには遺伝子重複によるサブタイプの存在が認められた。

次に、非視覚オプシン類の mRNA 発現を成魚の各種組織 RNA を用いた RT-PCR により検討した。パラピノプシン 2 および Opn4x2 以外は脳 RNA において増幅が認められた。エクソロドプシンおよび TMT オプシン以外は眼球において発現が認められた。Opn3、Opn4x1、Opn5 は有眼側・無眼側を問わず皮膚において発現が認められた。

非視覚オプシンの λ_{\max} を視物質再構成により測定した。Opn3、Opn4 および Opn5 は再構成が成
功せず測定出来なかった。それ以外の非視覚オプシンのうち、エクソロドプシンおよび VAL オプシ
ンの λ_{\max} は 500 nm 程度であり、パラピノプシン 1 および 2、パリエトプシン、TMT オプシンの λ_{\max}
は 400 nm 程度であった。

脳および眼球に発現するエクソロドプシンと VAL オプシンが約 500 nm に λ_{\max} をもつことから、
これら非視覚オプシンも緑色光照射による成長促進効果に関与する候補である可能性が示された。エ
クソロドプシンは一般的に松果体に発現することから、松果体—視交叉—視床下部軸の生物時計関連
因子との関連も考えられる。VAL オプシンは視床下部において発現する事例が他魚種で報告されて
いるため、内分泌的生理機能に直接的に関与する可能性も考えられる。サブタイプ間で発現組織が異
なるオプシンも多くみられたことから、遺伝子重複により生まれたサブタイプが様々な機能分化する
ことで、様々な生理機能に関連する非視覚的光受容に関与している可能性が示唆された。

【主要発表論文】

1: Kasagi S, Mizusawa K, Murakami N, Andoh T, Furufuji S, Kawamura S, Takahashi A. (2015) Molecular and
functional characterization of opsins in barfin flounder (*Verasper moseri*). Gene. 556(2), 182-191.

2: Takahashi A, Kasagi S, Murakami N, Furufuji S, Kikuchi S, Mizusawa K, Andoh T. (2016) Chronic effects of
light irradiated from LED on the growth performance and endocrine properties of barfin flounder *Verasper moseri*.
Gen Comp Endocrinol. 232, 101-8.

3: Kasagi S, Mizusawa K, Takahashi A. (2017) Green-shifting of SWS2A opsin sensitivity and loss of function
of RH2-A opsin in flounders, genus *Verasper*. Ecol Evol. 8(2), 1399-1410.

4: Takahashi A, Kasagi S, Murakami N, Furufuji S, Kikuchi S, Mizusawa K, Andoh T. (2018) Effects of different
green light intensities on the growth performance and endocrine properties of barfin flounder *Verasper moseri*.
Gen Comp Endocrinol. 257, 203-210.

5: Shimizu D, Kasagi S, Takeuchi R, Maeda T, Furufuji S, Mizusawa K, Andoh T, Takahashi A. (2019) Effects
of green light on the growth of spotted halibut, *Verasper variegatus*, and Japanese flounder, *Paralichthys
olivaceus*, and on the endocrine system of spotted halibut at different water temperatures. Gen Comp Endocrinol.
271, 82-90.