第 69 回日本電気泳動学会総会シンポジウム：
日本比較内分泌学会との共催 比較内分泌から電気泳動への秋波
論文種目：総説

カレイ目魚類における視物質遺伝子の分子進化

笠木 聡*・水澤寛太・高橋明義

北里大学 海洋生命科学部 魚類分子内分泌学研究室

(受付 2018 年 12 月 27 日, 受理 2019 年 1 月 24 日)

SUMMARY

To understand the growth facilitation effect of green light irradiation on barfin flounder (*Verasper moseri*), we characterized the visual opsin repertoire of *V. moseri*. *V. moseri* possessed one green-type opsin pseudogene, RH2-A. The wavelengths of maximum absorption spectra ($\lambda_{\max}$) for one blue-type opsin SWS2A (482 nm) was longer than the other species SWS2 (typically 430–460 nm), indicating that it is green-sensitive. The expression level of opsin genes along with ontogeny were measured by qRT-PCR. Green-sensitive opsins RH2-B and SWS2A were expressed at a constant level, and that of rhodopsin RH1 was increased with age, whereas the expressions of other opsin genes were decreased. We then identified visual opsin genes for additional three flounder species *V. variegatus*, *Microstomus achne*, and *Paralichthys olivaceus* to compare their functional characteristics with those of the barfin flounder. RH2-A was absent in *V. variegatus*, whereas that of *V. moseri* was pseudogenized. Moreover, RH2-A mRNA was not detected in *M. achne* and *P. olivaceus*, despite the presence of a functional reading frame, indicating RH2-A function seems to be reduced in flounders. SWS2A of *M. achne* (452 nm) and *P. olivaceus* (466 nm) were blue-sensitive, whereas that of *V. variegatus* (485 nm) was green-sensitive and comparable to *V. moseri* (482 nm), indicating that the SWS2A of the genus *Verasper* is functionally green-sensitive. Thus, the green-sensitive SWS2A is estimated to be derived from ancestral *Verasper* genus. Therefore, it is suggested that the sensitivity shift of SWS2A from blue to green may have compensated functional reduction of RH2-A.

Key words: *Verasper moseri*, opsin, molecular evolution

序 論

近年, カレイ目の魚種であるマツカワ (*Verasper moseri*) において, 背地色や照射光波長などの飼育時の光環境の違いにより成長が促進されることが報告された。様々な色フィルターを用いて特定波長光を照射した飼育実験の結果, 緑色および青色の光を照射した個体は赤色の光を照射した個体よりも良好な成長を示した。また, 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でも緑色光の照射により成長が亢進した^{1,2)}。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。光の強度

や照射時間の長短などが魚類に生理学的変化を起こす報告はこれまでもあったが, 光波長の違いが明確な影響を与えた知見は少ない。光波長の差による生理的状态の変化には, 色覚のような波長の違いを弁別可能な光受容系が関与すると考えられる。

脊椎動物の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

Molecular evolution of flounder visual opsin genes
Satoshi Kasagi, Kanta Mizusawa, Akiyoshi Takahashi
School of Marine Biosciences, Kitasato University

* Corresponding author: Satoshi Kasagi; School of Marine Biosciences, Kitasato University, 1-15-1, Kitazato, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan
E-mail: kasagi@kitasato-u.ac.jp

第69回日本電気泳動学会総会シンポジウム：日本比較内分泌学会との共催 比較内分泌から電気泳動への秋波

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。過去の知見から、少なくとも脊椎動物の共通祖先種において錐体オプシン LWS (赤型), RH2 (緑型), SWS2 (青型), SWS1 (紫外線型) および桿体オプシン RH1 が存在したことが強く示唆される³⁾。

脊椎動物の中でも特に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⁴⁾。

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、カレイ目の魚類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における視覚オプシンの単離及び機能解析、②カレイ目魚種間での視覚オプシンの比較研究による視覚オプシンの分子進化解析により、カレイ目の視覚オプシンについての検討を行い、特定波長光照射によるカレイ目魚類の成長促進効果を理解する端緒とした。

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、波長感受性および遺伝子発現量についてその機能を解析した⁵⁾。

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) に遺伝子重複し、SWS2 は 2 つのサブタイプ (SWS2A および SWS2B) に重複していた。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、全てのオプシン遺伝子について相同な遺伝子が共有されていることから、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ると考えられた。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 の発現は確認されなかった。またリーディングフレーム中に停止コドン変異が入ることにより偽遺伝子化していた。

マツカワの眼球において発現が確認された 7 つのオプシン遺伝子について、培養細胞を用いた視物質再構成による最大吸収波長 ($\lambda_{\max}$) 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 $\lambda_{\max}$ を示したが、SWS2A は 482 nm と、一般的な棘鰭上目魚の SWS2A ($\lambda_{\max}$: 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-

Fig. 1 Visual opsin repertoire of *V. moseri*

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。RH2-B, SWS2A および RH1 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の数が減少した。一方で SWS2A の長波長化により緑色光感受性のオプシンの数が増加した。また緑色光感受性である SWS2A および RH2-B の発現量には成長にともなう変動は認められなかった。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 ($\lambda_{\max}$: 506 nm) と SWS2A ($\lambda_{\max}$: 482 nm) の 2 種類のオプシンにより十分受容されうる (Fig. 1)。マツカワの視覚オプシンレパートリーおよび機能解析によって判明したことは、マツカワの緑色光感受性オプシン構成 (2 遺伝子の RH2 および SWS2A) は他の棘鰭上目魚類のそれ (3 遺伝子の RH2) と比べて特殊であることであった。そのため、マツカワ特有の緑色光感受性視覚オプシンが、マツカワに対する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。具体的には、SWS2A オプシンが緑色光感受性であることが成長促進効果と関連があるのではないかと推測が生じた。

カレイ目魚類における視覚オプシンの分子進化解析

マツカワと同じく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ことが報告された⁶⁾。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たことから、カレイ目の系統内では色覚機能が保存的であり、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⁷⁾。

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。4 種の全てが LWS, SWS2A, SWS2B, SWS1 および RH1 を持ち、眼球において発現が確認された。緑色光感受性オプシンの RH2-A, RH2-B, RH2-C のうち、RH2-B は全ての種において眼球での発現が確認された。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、成魚の眼球において mRNA 発現は認められなかった。ホシガレイの RH2-A はゲノム中に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 (Table 1)。

演繹アミノ酸配列を比較し、既知の SWS2 オプシンの波長調節アミノ酸残基を比較した。その結果、SWS2A の波長調節アミノ酸サイトには 4 種間で差異が認められた。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 $\lambda_{\max}$ 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 $\lambda_{\max}$ は各々 482 nm および 485 nm であり長波長感受性であった。一方で、ババガレイおよびヒラメ SWS2A の $\lambda_{\max}$ は各々 466 nm および 452 nm 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 $\lambda_{\max}$ を測定した。その結果、カレイ目祖先 (462 nm) およびカレイ科祖先 (465 nm) は長波長化しておらず、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ったと考えられた。カレイ科祖先～マツカワ属祖先の系統間では 8 つのアミノ酸変異が起き

ていると想定されたため、これらの変異のうち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アミノ酸の側鎖が位置する。この位置は以前、波長調節アミノ酸サイトとして報告されていた変異であった。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 (+17 nm 中の 14 nm) を担うことが判明した (Fig. 2)。

以上から、カレイ目の系統内において大部分のオプシン遺伝子レパートリーは類似しているものの、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) していた。このことから、マツカワ属系統では SWS2A が長波長化 (青色感受性から緑色感受性へ変化) した後、余剰になった緑色感受性のオプシンのうちのひとつ (RH2-A) が偽遺伝子化または消失したと推測される。つまり、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 (Fig. 3)。以上のことから、緑色光による成長促進効果と SWS2A の長波長化には直接的な相関は見出せなかったものの、緑色光感受性を担うオプシン (RH2 および SWS2A) 機能の種間差が大きいことは、カレイ目全体において緑色光感受性になんらかの適応的意義があった可能性を示唆する。

Fig. 2 Functional evolution of SWS2A

Table 1 Visual opsin repertoire of flounders

タイプ	サブタイプ	マツカワ	ホシガレイ	ババガレイ	ヒラメ
		$\lambda_{\max}$ (nm)	存在および発現		
赤	LWS	552	○	○	○
緑	RH2-A	偽遺伝子	消失	△	△
	RH2-B	506	○	○	○
	RH2-C	490	○	消失	○
青	SWS2A	482	○	○	○
	SWS2B	416	○	○	○
紫外線	SWS1	367	○	○	○
桿体	RH1	494	○	○	○

○: exist and expressed △: exist but not expressed

Fig. 3 Functional evolution of green-sensitive opsin genes in genus *Verasper*

結 論

緑感受性を担うカレイ目オプシンの特徴として、ババガレイおよびヒラメは機能的な RH2-A を持つにもかかわらず成魚眼球で発現しないこと、また RH2-A が失われているマツカワ属においてはあたかも機能を補うように SWS2A が長波長感受性化していることが挙げられる。これらの視覚オプシン機能が緑色光照射による成長促進効果に関連するのかどうかを詳細に検討するために以下の課題が考えられる。第一に、偽遺伝子化していない種において RH2-A が発現する（眼球を含めた）組織や時期が存在しないか検討を行うべきと考える。その方策として成魚以外の成長段階における RH2-A を含めた各種オプシンの発現動態の調査、および眼球以外での発現の検討が挙げられる。第二に、脊椎動物において多く報告されている視覚に関与しない非視覚オプシンの検討が挙げられる。発現する組織も遺伝子も多岐にわたる非視覚オプシンを含めた上で組織発現の検討や $\lambda_{\max}$ の解析を行うことで、成長促進効果を示す特定波長光の入力系解明につながるものと期待されるためである。

本論文に関して開示すべき利益相反状態は無い。

謝 辞

本研究の一部は生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）」の支援を受けて行った。

文 献

- 1) Takahashi A, Kasagi S, Murakami N, Furufuji S, Kikuchi S, Mizusawa K, Andoh T. Chronic effects of light irradiated from LED on the growth performance and endocrine properties of barfin flounder *Verasper moseri*. Gen Comp Endocrinol. 2016;232:101–108.
- 2) Takahashi A, Kasagi S, Murakami N, Furufuji S, Kikuchi S, Mizusawa K, Andoh T. Effects of different green light intensities on the growth performance and endocrine properties of barfin flounder *Verasper moseri*. Gen Comp Endocrinol. 2018;257:203–210.
- 3) Davies WL, Collin SP, Hunt DM. Adaptive gene loss reflects differences in the visual ecology of basal vertebrates. Mol Biol Evol. 2009;26:1803–1809.
- 4) Gojobori J, Innan H. Potential of fish opsin gene duplications to evolve new adaptive functions. Trends Genet. 2009;25:198–202.
- 5) Kasagi S, Mizusawa K, Murakami N, Andoh T, Furufuji S, Kawamura S, Takahashi A. Molecular and functional characterization of opsins in barfin flounder (*Verasper moseri*). Gene. 2015;556:182–191.
- 6) Shimizu D, Kasagi S, Takeuchi R, Maeda T, Furufuji S, Mizusawa K, Andoh T, Takahashi A. 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. 2019;271:82–90.
- 7) Kasagi S, Mizusawa K, Takahashi A. Green-shifting of SWS2A opsin sensitivity and loss of function of RH2-A opsin in flounders, genus *Verasper*. Ecol Evol. 2017;8:1399–1410.