

第4章 条鰭綱における *Opn4* 遺伝子の多様化過程

4-1 結果

4-1-1 シンテニー解析

Opn4 遺伝子については、真骨魚類が持つ5つの遺伝子のうち1つ (*Opn4m2*) がイントロンを含まない。そこで、条鰭綱の進化過程の中でいつ *Opn4m2* を獲得したのかを明らかにするため、条鰭綱の中でも比較的古くに分岐したと考えられている魚類のゲノム情報から、*Opn4* 遺伝子のレパートリーとゲノム上の位置を調べた。具体的には、非真骨魚類のポリプテルス目 (ポリプテルス・セネガルス及びアミメウナギ)、チョウザメ目 (コチョウザメ及びヘラチョウザメ)、ガー目 (スポッテッドガー) と真骨魚類のアロワナ上目 (アジアアロワナ) のゲノムで *Opn4* 遺伝子を比較した (図4-1)。*Opn4m2* 遺伝子は、アジアアロワナのゲノムにおいては、*tmx3* 遺伝子上流に位置しており、3R WGD で重複したパラログなシンテニーブロック上には存在しない。スポッテッドガーのゲノムからは *Opn4m2* 遺伝子が1遺伝子見つかり、共通のシンテニーブロック上に存在していた。またチョウザメ目の2種 (コチョウザメ及びヘラチョウザメ) においては、周辺遺伝子の逆位や転移などの再構成が起こっているが、共通のシンテニーブロックを2つ見出すことができ、両方に *Opn4m2* の偽遺伝子が存在していることが確認できた。これらはチョウザメ科及びヘラチョウザメ科特異的な全ゲノム重複 (4R) によりそれぞれ重複したパラログ遺伝子であると考えられる⁷⁷。なお、コチョウザメ及びヘラチョウザメの *Opn4m2* 偽遺伝子では共通して26番目に終止コドンが生じている (図4-2)。このことから、*Opn4m2* の偽遺伝子化はチョウザメ科及びヘラチョウザメ科が分岐する前の、チョウザメ目の共通祖先において起こった可能性が示唆される。一方で、ポリプテルス目の2種 (ポリプテルス・セネガルス及びアミメウナギ) のゲノムからは *Opn4m2* 遺伝子が見つからず、対応するシンテニーブロック内に存在しないことも確認できた。このことから、*Opn4m2* 遺伝子はポリプテルス目の分岐後に retroduplication で獲得されたと考えられる。

コピー元の intron-containing *Opn4m* 遺伝子については、条鰭綱において共通して、*usp54* 遺伝子と *ldb3* 遺伝子の間という系統間でよく保存されたシンテニーブロック内に存在することが確認できた。*Opn4x* 遺伝子については、真骨魚類のアジアアロワナのゲノム上では、*pdlm5* 遺伝子上流に位置しており、スポッテッドガーのゲノムにおいても共通のシンテニーブロック上に *Opn4x* 遺伝子が存在していることが確認できた。一方で、ポリプテルス目及びチョウザメ目のゲノムからは *Opn4x* 遺伝子が見つからず、対応するシンテニーブロック内に存在しないことも確認できた。このことから、*Opn4x* 遺伝子はポリプテルス目とチョウザメ目でそれぞれ独立に喪失したと考えられる。以上の結果から、*Opn4* 遺伝子のレパ

ートリーは、条鰭綱において retroduplication、全ゲノム重複、及び遺伝子喪失によって系統ごとに独立に多様化しているということがわかった。

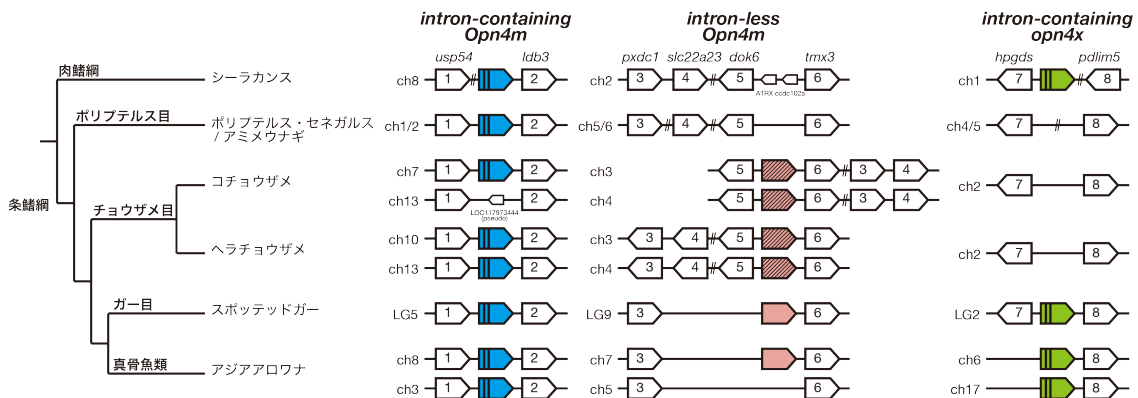


図 4-1 条鰭綱の *Opn4* 遺伝子レパートリーの比較

条鰭綱における intron-containing *Opn4m* 遺伝子 (ストライプ入りの青色矢印)、intron-less *Opn4m* 遺伝子 (桃色矢印)、及び intron-containing *Opn4x* 遺伝子 (ストライプ入りの緑色矢印) に隣接するオースログ遺伝子の比較。*Opn4* 遺伝子の遺伝子座に隣接する遺伝子は数字を入れた白色矢印で示した。網掛けは偽遺伝子であることを示す。各遺伝子の名称は以下の通りである：*ubiquitin specific peptidase 54 (usp54)* (遺伝子 1), *LIM domain binding 3 (ldb3)* (遺伝子 2), *PX domain containing 1 (pxdc1)* (遺伝子 3), *solute carrier family 22 member 23 (slc22a23)* (遺伝子 4), *docking protein 6 (dok6)* (遺伝子 5), *thioredoxin related transmembrane protein 3 (tmx3)* (遺伝子 6), *hematopoietic prostaglandin D synthase (hpgds)* (遺伝子 7), *PDZ, and LIM domain 5 (pdlim5)* (遺伝子 8). 各遺伝子の略称はシーラカンスのシンテニブブロックの図上に記した。二重斜線は遺伝子座の省略を示す。

	20	30
		
<i>B. taurus</i> Rh1	VRSPFEAPQY	YLAEP
<i>L. oculatus</i> <i>Opn4m2</i>	PISEDINPFP	TVEVP
<i>A. ruthenu</i> <i>Opn4m2-1</i>	TVPEVT*PFL	TVDGQ
<i>A. ruthenu</i> <i>Opn4m2-2</i>	TVPEVT*LFP	TVDVQ
<i>P. spathula</i> <i>Opn4m2-1</i>	TVPEVT*PFP	TVDVQ
<i>P. spathula</i> <i>Opn4m2-2</i>	TVPEVT*PFP	TVMLA

図 4-2 チョウザメ目の *Opn4m* 偽遺伝子のアミノ酸配列の比較

ウシ ロドプシン (*B. taurus* Rh1, K00506)、スポットテッドガー *Opn4m2* (*L. oculatus* *Opn4m2*, Gene ID: 102695598)、コチョウザメ *Opn4m2* 偽遺伝子 (*A. ruthenu* *Opn4m2-1*, 117400101; *Opn4m2-2*, 117394593)、及びヘラチョウザメ *Opn4m2* 偽遺伝子 (*P. spathula* *Opn4m2-1*, 121307772) のアミノ酸配列を、Clustal W を用いてアラインメントした⁶¹。配列上にウシ ロドプシンの対応するアミノ酸番号を記した。なお、ヘラチョウザメ *Opn4m2-2* については、whole-genome shotgun sequence (JADDYA010000170.1: 127199–127727) を対象とした BLAST 検索により発見した。

4-1-2 発現領域解析

4-1-2-1 網膜における発現領域解析

次に、条鰭綱において *Opn4* 遺伝子レパートリーが多様化したことに伴って、各 *Opn4* 遺伝子の局在に違いが生じたのかを調べるため、非真骨魚類 (ポリプテルス・セネガルス、シベリアチョウザメ、及びスポッテッドガー) と真骨魚類 (メダカ及びゼブラフィッシュ) の網膜において *in situ* hybridization による解析を行った (図 4-3, 図 4-4)。

ポリプテルス・セネガルの *Opn4m* 遺伝子は、外網状層 (OPL) に隣接する細胞の多くで発現シグナルが検出され、これらは水平細胞であると推測される (図 4-3 A,B)。また内顆粒層 (INL) や神経節細胞層 (GCL) に位置する一部の細胞でも発現が見られ、これらはアマクリン細胞、双極細胞、或いはミュラー細胞、及び神経節細胞であると推測される。同様にシベリアチョウザメの *Opn4m1* の mRNA シグナルも、OPL の多くの細胞と、INL や GCL の一部の細胞で検出された (図 4-3 C,D)。これらに加えて、シベリアチョウザメの *Opn4m1* の mRNA シグナルは、網膜色素上皮 (RPE) でも検出された。

スポッテッドガーにおいては、intron-containing *Opn4m* 遺伝子 (*Opn4m1*) は OPL の多くの細胞と、INL や GCL の一部の細胞で検出され、ポリプテルス・セネガルとシベリアチョウザメの intron-containing *Opn4m* 遺伝子の局在パターンと一致していた (図 4-3 E, F)。また、スポッテッドガーの *Opn4m1* の RPE での発現も、網膜の眼底において確認できた (図 4-3 K-O)。一方、intron-less *Opn4m* 遺伝子 (*Opn4m2*) の発現シグナルが検出されるのは、OPL の少数の細胞に限られており、*Opn4m1* 遺伝子を発現する細胞に比べて *Opn4m2* 遺伝子を発現する細胞は少なかった (図 4-3 G, H)。なお *Opn4x* の mRNA シグナルについては、OPL にて弱く検出されるとともに、INL や GCL の一部の細胞で検出され、局在パターンは *Opn4m1* と類似していた (図 4-3 I, J)。

次に、真骨魚類 (メダカ及びゼブラフィッシュ) の網膜における *Opn4* 遺伝子の局在を比較した (図 4-4)。メダカにおいては、intron-containing *Opn4m* 遺伝子のうち、*Opn4m1* は OPL の多くの細胞と INL の一部の細胞に、*Opn4m3* は INL と GCL の一部の細胞で mRNA シグナルが検出された (図 4-4 A, B, E, F)。intron-less *Opn4m* 遺伝子 (*Opn4m2*) の mRNA シグナルについては、OPL の一部の細胞にのみ検出された (図 4-4 C, D)。これらメダカの *Opn4m* 遺伝子の局在パターンは、非真骨魚類のガー目で観察されたものと一致している (図 4-3)。一方ゼブラフィッシュの網膜においては、*Opn4m2* の mRNA シグナルが OPL で強く検出され、*Opn4m2* 遺伝子を発現する細胞が多いことが分かった (図 4-4 M, N)。また *Opn4m1* は INL の一部の細胞に、*Opn4m3* は OPL と INL の一部の細胞に発現していることが確認できた (図 4-4 K, L, O, P)。このゼブラフィッシュでの発現領域解析は先行研究でも行われており、その結果は本研究の結果と一致する^{43,44,78}。これらの結果から、*Opn4m* 遺伝子の mRNA の網膜での発現パターンは真骨魚類の種によって異なり、非真骨魚類のスポッテッドガーでは限局的である intron-less *Opn4m* 遺伝子の発現は、ゼブラフィッシュの網膜においては増

加しているということが分かった。

また *Opn4x* 遺伝子については、いずれの真骨魚類においても、*Opn4x1* 及び *Opn4x2* の mRNA は共に INL の一部の細胞に発現し、*Opn4x1* よりも *Opn4x2* の方がより強い発現シグナルが検出された (図 4-4 G-J, Q-T)。スポットテッドガー、メダカ、及びゼブラフィッシュにおける *Opn4x* 遺伝子の局在パターンを比べると、INL の一部の細胞に局在するという条鰭綱で共通点が見出された。

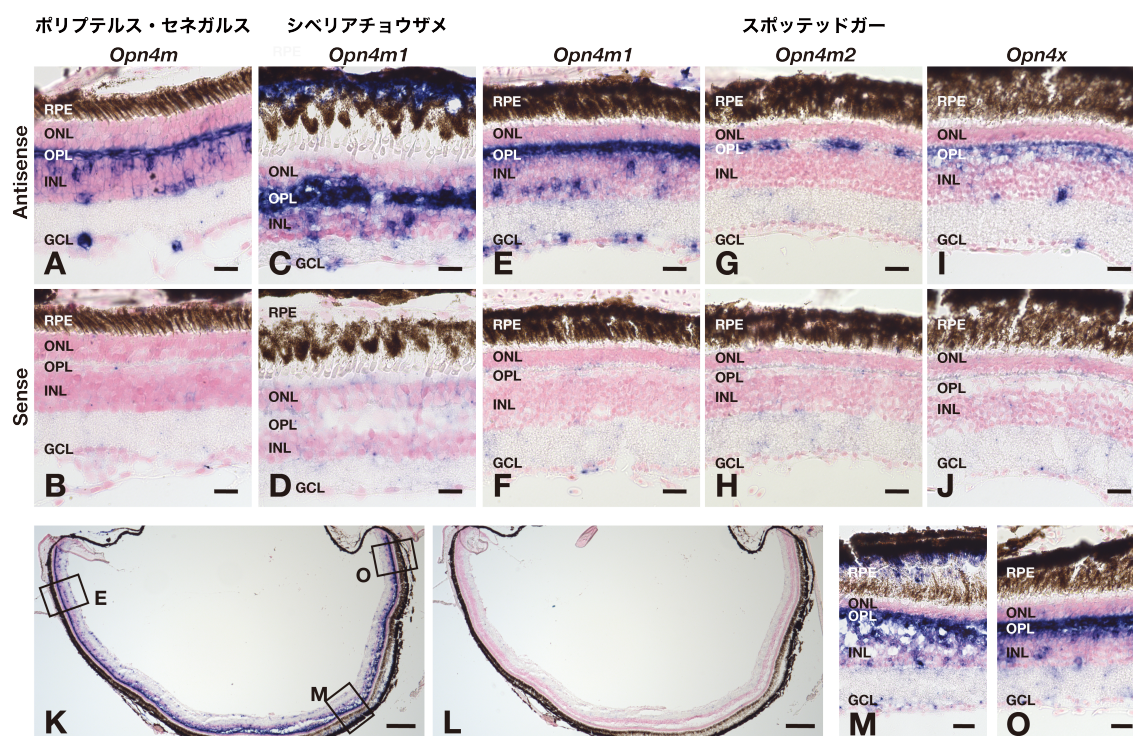


図 4-3 非真骨魚類の網膜における *Opn4* 遺伝子の発現分布

A-J, ポリプテルス・セネガルス intron-containing *Opn4m* 遺伝子 (A, B)、シベリアチョウザメ intron-containing *Opn4m1* 遺伝子 (C, D)、並びにスポットテッドガー intron-containing *Opn4m1* 遺伝子 (E, F)、intron-less *Opn4m2* 遺伝子 (G, H)、及び intron-containing *Opn4x* 遺伝子 (I, J) の mRNA の網膜における発現分布。これらの切片では、各オプシンの mRNA の発現を antisense probe (A, C, E, G, I) 或いは sense probe (B, D, F, H, J) により検出した。K-L, スポットテッドガー intron-containing *Opn4m1* 遺伝子の mRNA の網膜全域における発現分布。これらの切片では、*Opn4m1* 遺伝子の mRNA の発現を antisense probe (K, M, L) 或いは sense probe (L) により検出した。K 中の腹側 (E)、眼底 (M)、及び背側 (O) をそれぞれ拡大した図を合わせて示した。Scale bar: 200 μm (K, L), 20 μm (A-J, M, O)

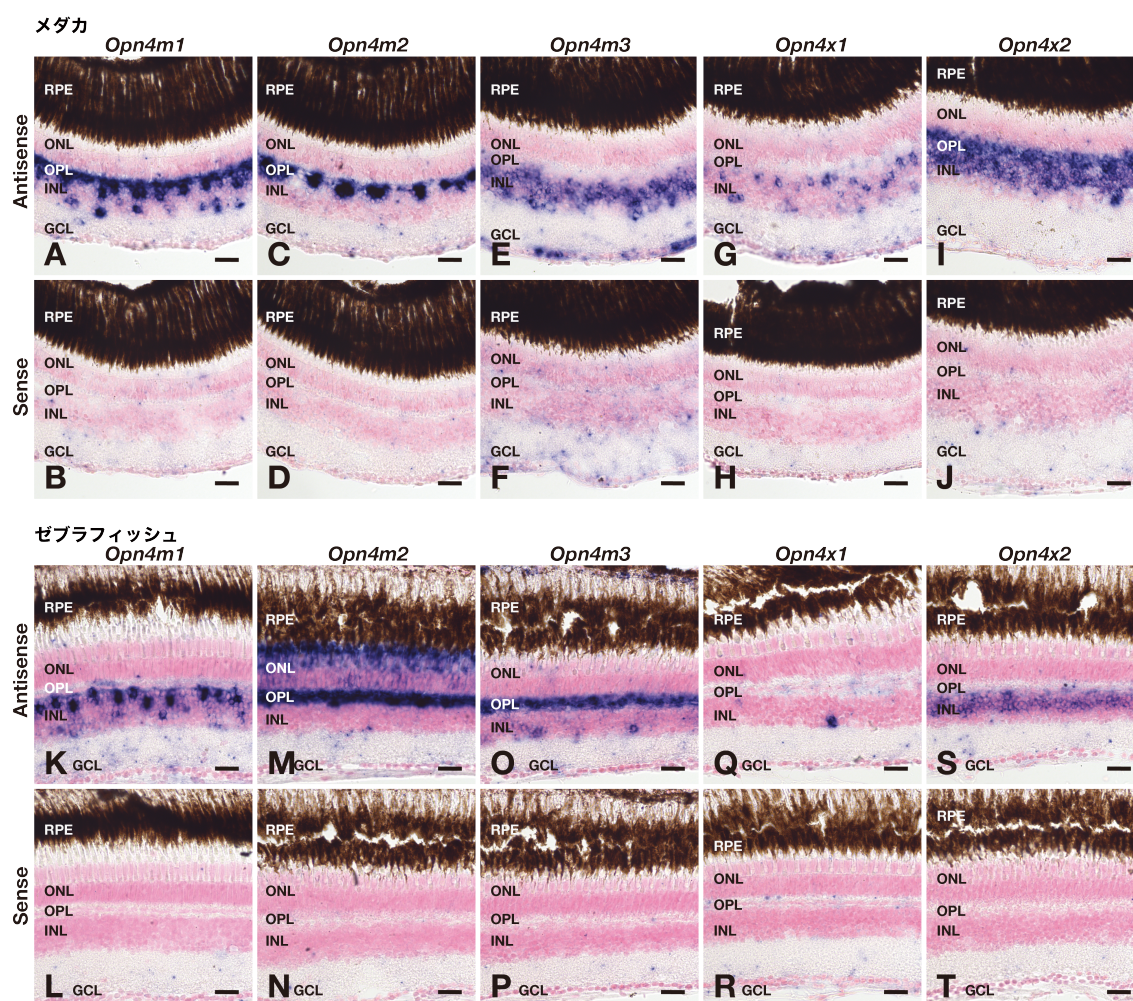


図 4-4 真骨魚類の網膜における *Opn4* 遺伝子の発現分布

A–J, メダカ *Opn4m1* 遺伝子 (A, B)、*Opn4m2* 遺伝子 (C, D)、*Opn4m3* 遺伝子 (E, F)、*Opn4x1* 遺伝子 (G, H)、及び *Opn4x2* 遺伝子 (I, J) の mRNA の網膜における発現分布。K–T, ゼブラフィッシュ *Opn4m1* 遺伝子 (K, L)、*Opn4m2* 遺伝子 (M, N)、*Opn4m3* 遺伝子 (O, P)、*Opn4x1* 遺伝子 (Q, R)、及び *Opn4x2* 遺伝子 (S, T) の mRNA の網膜における発現分布。これらの切片では、各オプシンの mRNA の発現を antisense probe (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S) 或いは sense probe (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T) により検出した。Scale bar: 20 μ m

4-1-2-2 脳における発現領域解析

さらに、非真骨魚類 (ポリプテルス・セネガルス、シベリアチョウザメ、及びスポッテッドガー) と真骨魚類 (メダカ及びゼブラフィッシュ) の脳においても *in situ* hybridization による解析を行い、*Opn4* 遺伝子の局在を調べた (図 4-5, 4-6, 4-7)。

まず非真骨魚類においては、終脳、間脳、及び中脳において mRNA シグナルを検出した。具体的には、ポリプテルス・セネガルスにおいては、終脳の腹側野 (Vv)、視索前野 (POA)、及び間脳の視床 (Th) の細胞で *Opn4m* 遺伝子の発現が確認された (図 4-5 A-F)。シベリアチョウザメにおいては、終脳の背側野 (Dm)、視索前野 (NPOp) の脳脊髄液接触ニューロン、及び間脳の視床下部 (AT, PVO) で mRNA シグナルが検出された (図 4-5 G-L)。スポッテッドガーの 3 種類の *Opn4* 遺伝子 (*Opn4m1*, *opn4m2*, *Opn4x*) については終脳、間脳、及び中脳においてそれぞれ異なる発現パターンが見られた (図 4-6)。*Opn4m1* については、嗅球 (OB)、終脳の腹側野 (Vv)、視索前野 (POA)、間脳の視床下部 (PNH)、及び中脳の視蓋 (OT) で mRNA シグナルが検出された (図 4-6 A-H)。*Opn4x* については、終脳 (Vv) 及び間脳の手綱核 (dHb) で mRNA シグナルが検出された (図 4-6 Q-X)。しかし intron-less *Opn4m* (*Opn4m2*) については、これらの脳領域では mRNA シグナルが検出されなかった (図 4-6 I-P)。

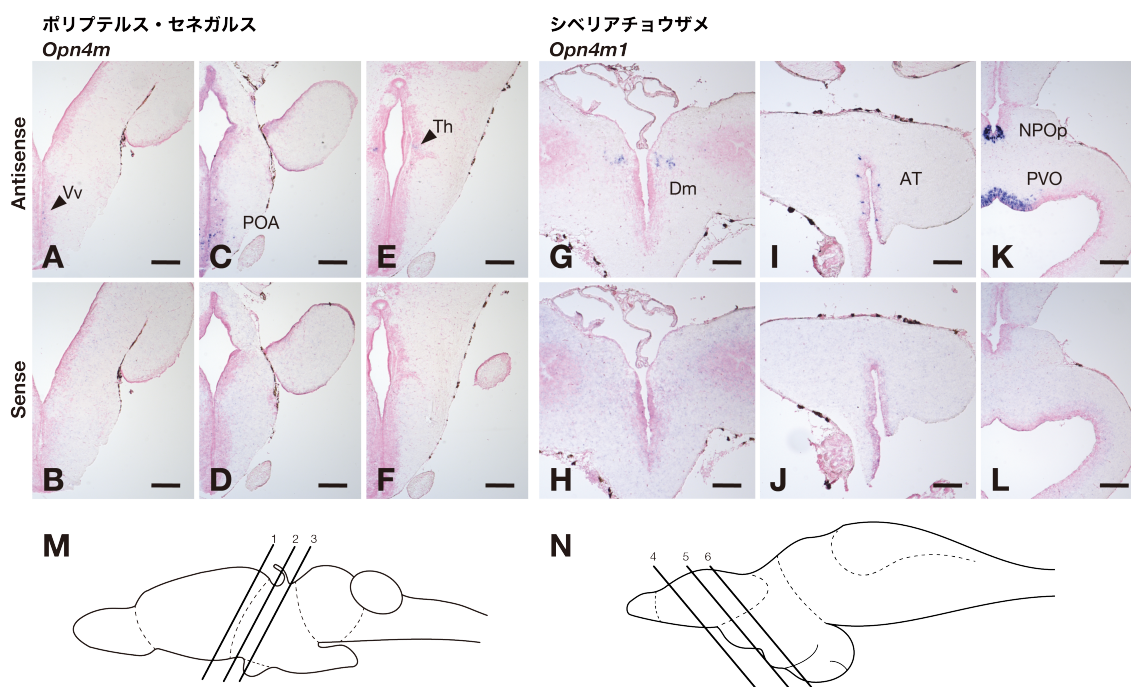


図 4-5 ポリプテルス・セネガルス及びシベリアチョウザメの脳における *Opn4* 遺伝子の発現分布

A-L, ポリプテルス・セネガルス *Opn4m* 遺伝子 (A-F) 及びシベリアチョウザメ *Opn4m1* 遺伝子 (G-L) の mRNA の脳における発現分布。これらの切片では、各オブシンの mRNA の発現を

antisense probe (**A, C, E, G, I, K**) 或いは sense probe (**B, D, F, H, J, L**) により検出した。Scale bar: 200 μ m **M, N**, ポリプテルス・セネガルス (**M**) 及びシベリアチョウザメ (**N**) の脳の側面図。斜線はそれぞれ **A, B** (line 1)、**C, D** (line 2)、**E, F** (line 3)、**G, H** (line 4)、**I, J** (line 5)、**K, L** (line 6) の切断面を示す。

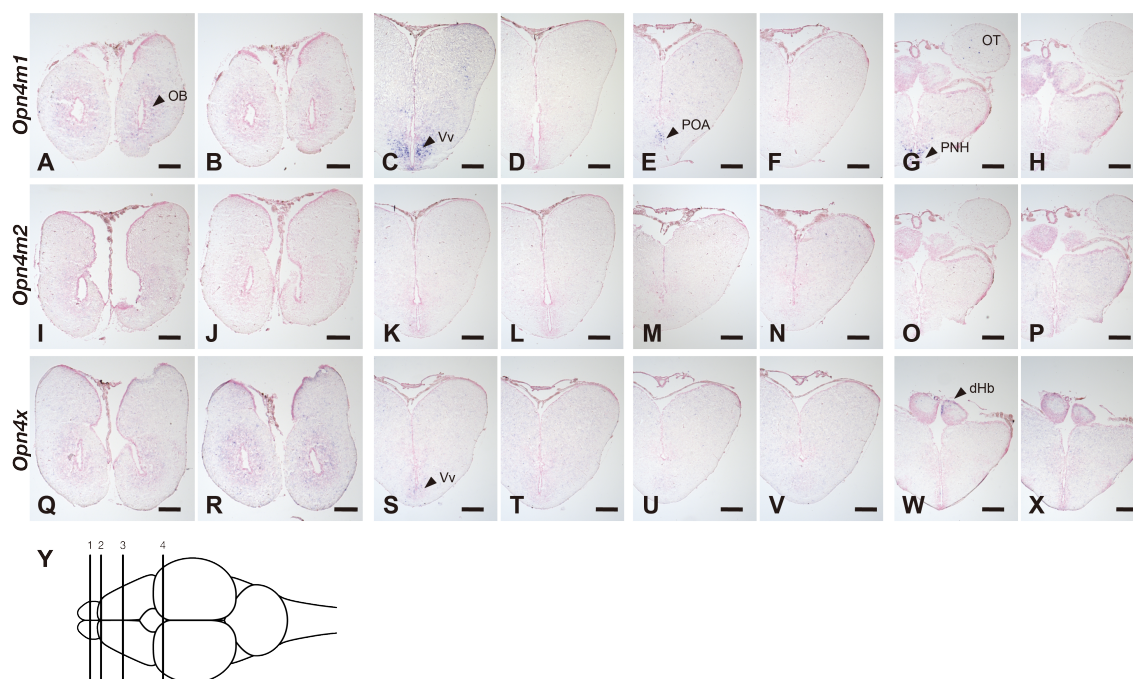


図 4-6 スポットテッドガーの脳における *Opn4* 遺伝子の発現分布

A-X, スポットテッドガー *Opn4m1* 遺伝子 (**A-H**)、*Opn4m2* 遺伝子 (**I-P**)、及び *Opn4x* 遺伝子 (**Q-X**) の mRNA の脳における発現分布。これらの切片では、各オプシンの mRNA の発現を antisense probe (**A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S, U, W**) 或いは sense probe (**B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, V, X**) により検出した。Scale bar: 200 μ m **Y**, スポットテッドガーの脳の背面図。斜線はそれぞれ **A, B**, **I, J, Q, R** (line 1)、**C, D, K, L, S, T** (line 2)、**E, F, M, N, U, V** (line 3)、**G, H, O, P, W, X** (line 4) の切断面を示す。

次に、真骨魚類（メダカ及びゼブラフィッシュ）の脳における *Opn4* 遺伝子の局在を比較した（図 4-7）。*Opn4m* 遺伝子については、メダカにおいては広範囲で mRNA シグナルが検出された（図 4-7 A-F）。特に *Opn4m2* は、嗅球（OB）、終脳の背側野（Dm）、腹側野（Vd, Vs, Vv）及び視索前野（POA）、間脳の視床（Th）及び視床下部（VT, AT, PT, NRP, IL）、中脳の視蓋（OT）、加えて小脳の小脳体（CCe）という広範囲で mRNA シグナルが検出された（図 4-6 C, D）。また *Opn4m1* は終脳の腹側野（Vd, Vs, Vv）及び視索前野（POA）、間脳の視床下部（VT, AT, PT）に、*Opn4m3* は終脳の腹側野（Vv）及び視索前野（POA）、間脳の視床（Th）、手綱核（dHb）、及び視床下部（VT, AT, PT, IL）に mRNA シグナルが検出され、基本的に *Opn4m2* の発現場所と重複していた（図 4-7 A, B, E, F）。一方ゼブラフィッシュにおいては、*Opn4m2* の mRNA シグナルは松果体でのみ検出され、*Opn4m1* 及び *Opn4m3* 遺伝子の方が、終脳（Dm, POA）及び間脳（vHb, Th, AT, Hv）のより広範な領域で mRNA シグナルが検出された（図 4-7 K-P）。ゼブラフィッシュの脳内での *Opn4* 遺伝子の発現レベルは極めて低いとの先行研究の報告があるが、本結果はそれと一致する²²。したがって、*Opn4m* 遺伝子の mRNA の脳での発現パターンは、真骨魚類の種によって異なり、非真骨魚類のスポッテッドガーでは見られなかった intron-less *Opn4m* 遺伝子の発現が、メダカにおいては脳の広範囲へと拡大しているということが分かった。

また *Opn4x* 遺伝子についても、メダカとゼブラフィッシュとの間で発現パターンに違いが見られた（図 4-6 G-J, Q-T）。例えば終脳の背側野（Dm）の吻側の表層部分には、メダカでは *Opn4x2* が発現している一方で、ゼブラフィッシュでは *Opn4x1* が発現していた。また、メダカの *Opn4x* 遺伝子は視索前野（POA）及び間脳視床下部（AT, PT）においても発現が確認されたが、ゼブラフィッシュの *Opn4x* 遺伝子の mRNA シグナルは終脳（Dm）を除いて検出されなかった。以上のことから、真骨魚類においても *Opn4* 遺伝子は終脳、間脳、及び中脳に発現するという非真骨魚類と保存されたパターンは見出されるものの、各パラログ遺伝子がどのように局在しているかは、種によって異なるということがわかった。

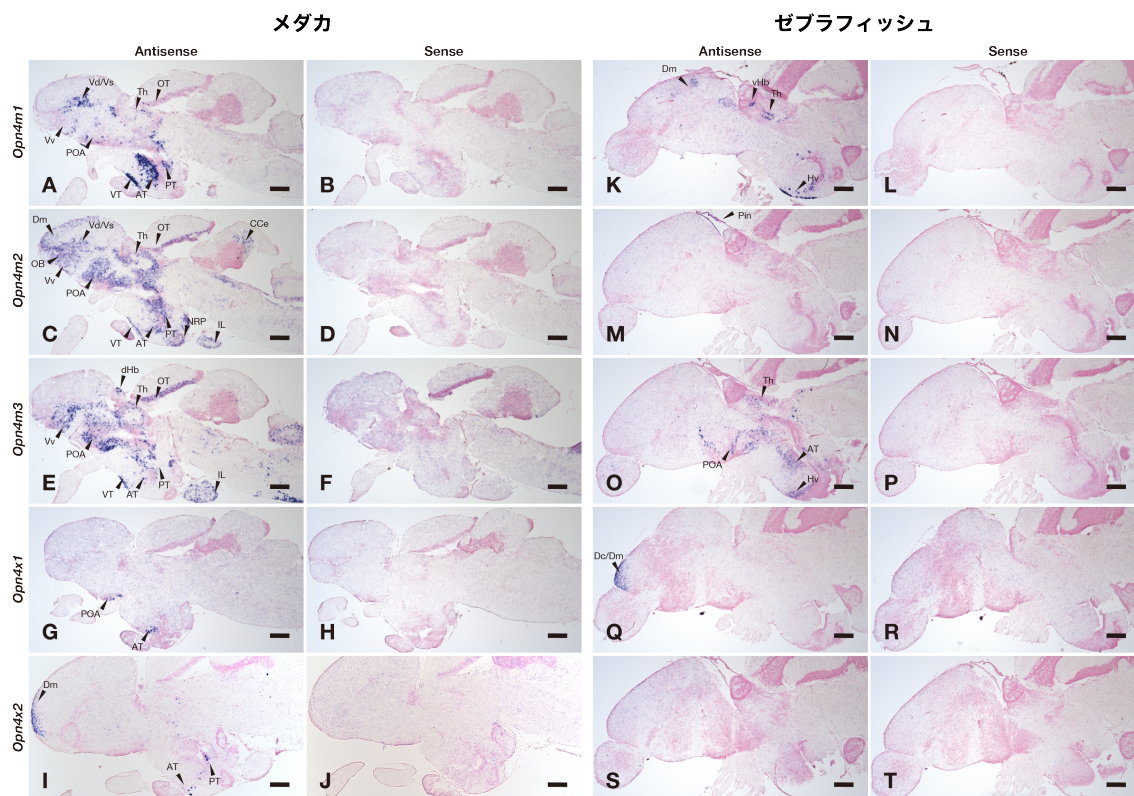


図 4-6 真骨魚類の脳における *Opn4* 遺伝子の発現分布

A–J, メダカ *Opn4m1* 遺伝子 (A, B)、*Opn4m2* 遺伝子 (C, D)、*Opn4m3* 遺伝子 (E, F)、*Opn4x1* 遺伝子 (G, H)、及び *Opn4x2* 遺伝子 (I, J) の mRNA の脳における発現分布。K–T, ゼブラフィッシュ *Opn4m1* 遺伝子 (K, L)、*Opn4m2* 遺伝子 (M, N)、*Opn4m3* 遺伝子 (O, P)、*Opn4x1* 遺伝子 (Q, R)、及び *Opn4x2* 遺伝子 (S, T) の mRNA の脳における発現分布。これらの切片では、各オプシン遺伝子の mRNA の発現を antisense probe (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S) 或いは sense probe (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T) により検出した。Scale bar: 200 μ m

4-1-3 タンパク質分子の性質の解析

最後に、条鰭綱の *Opn4* 遺伝子の発現場所だけではなく、それがコードするタンパク質分子の性質にも違いがあるのかを調べるため、*Opn4* タンパク質の性質の比較解析を行った。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 *Opn4* のリコンビナントタンパク質を HEK293S 細胞で発現させ、11-*cis* 型レチナールを添加して光受容タンパク質を調製した。本研究では、*Opn4* タンパク質の発現量を高めるため、先行研究に倣って C 末端領域のアミノ酸を切除したリコンビナントタンパク質を用いた⁵³。なお、オプシン類の中で脊椎動物の *Opn4* と分子系統的に近縁である頭足類のロドプシンにおいて、C 末端領域の切除はタンパク質の光反応性に影響を与えないという先行研究がある^{79,80}。また、C 末端を切除したマウス *Opn4* のリコンビナントタンパク質の吸収スペクトルは、マウス網膜の *Opn4* 発現神経節細胞から得られた電氣的応答の波長依存性と一致している^{53,81}。したがって、本研究においても、C 末端の切除は条鰭綱の *Opn4* の光反応性に対して大きな影響を及ぼさないものと考ええる。

まず、条鰭綱 *Opn4* の吸収スペクトルを解析した。ポリプテルス・セネガルス及びシベリアチョウザメの *Opn4* については、精製タンパク質を調製することができなかった。これは、タンパク質の安定性が低いためであると考えられる。そこで、光受容タンパク質を発現させた細胞膜から、1% DDM で可溶化させることで取得した抽出サンプルに対し、30 mM の hydroxylamine 存在下で黄色光を照射し、光照射前から光照射後のスペクトルの差を計算することで差吸収スペクトルを算出した (図 4-9 A, B)。この差吸収スペクトルに基づき、*Opn4* 遺伝子の $\lambda_{\max}$ を算出したところ、ポリプテルス・セネガルスの *Opn4m* は 473 nm、シベリアチョウザメの *Opn4m1* は 479 nm といずれも青色光感受性を示した。スポッテッドガー及びメダカの *Opn4* については、精製タンパク質を調製することができ、吸収スペクトルを解析した。その結果、スポッテッドガーの *Opn4m* (*Opn4m1* 及び *Opn4m2*) は、*Opn4x* に比べて長波長側に吸収極大があった (図 4-9 C)。メダカにおいても同様に、*Opn4m* (*Opn4m1*, *Opn4m2*, *Opn4m3*) は *Opn4x* (*Opn4x1*, *Opn4x2*) に比べて長波長側に吸収極大があった (図 4-9 D)。したがって、条鰭綱 *Opn4* の吸収スペクトルには、*Opn4m* の $\lambda_{\max}$ (470–480 nm) が *Opn4x* の $\lambda_{\max}$ (450–470 nm) に比べて長波長シフトしているという共通の分子特性が確認できた。なお、これらの $\lambda_{\max}$ は先行研究で報告されている他の脊椎動物の *Opn4* タンパク質の $\lambda_{\max}$ とも一致するものである^{43,53,82,83}。

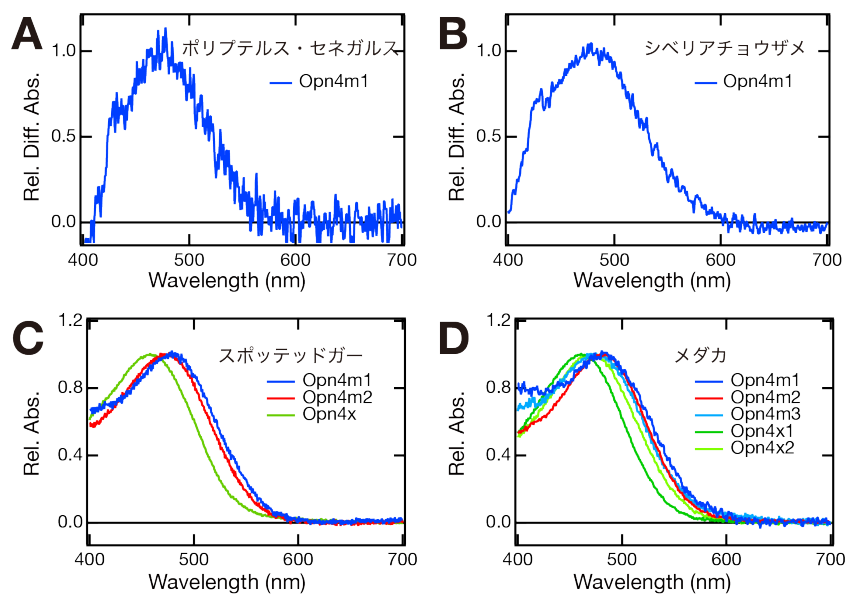


図 4-9 条鰭綱の Opn4 の吸収スペクトルの測定

A, B ポリプテルス・セネガリスの Opn4m (**A**, $\lambda_{\max}=473$ nm) 及びシベリアチョウザメの Opn4m1 (**B**, 479 nm) の差吸収スペクトル。Opn4 を発現させた細胞膜から 1% DDM により可溶化させることで取得した抽出サンプルに対し、30 mM の hydroxylamine 存在下で黄色光を照射し、光照射前から光照射後のスペクトルの差を計算することで差吸収スペクトルを算出した。**C, D**, スポットドガーの Opn4m1 ($\lambda_{\max}=482$ nm)、Opn4m2 (477 nm) 及び Opn4x1 (461 nm) (**C**)、並びにメダカの Opn4m1 (487 nm)、Opn4m2 (482 nm)、Opn4m3 (480 nm)、Opn4x1 (463 nm)、及び Opn4x2 (474 nm) (**D**) の吸収スペクトル。1% DDM で可溶化させて取得した抽出サンプルをアフィニティーカラムクロマトグラフィーにかけることで Opn4 の精製タンパク質を調製し吸収スペクトルを測定した。

さらに、条鰭綱の Opn4 タンパク質の G タンパク質活性化能についても解析した。Opn4 は一般的に Gq 型 G タンパク質を活性化し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を光依存的に誘導する^{56,84,85}。そこで、HEK293S 細胞にカルシウムセンサータンパク質 (イクオリン) を導入し、発光に基づいて細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定するレポーターアッセイにより、条鰭綱の Opn4 タンパク質の Gq 型 G タンパク質の活性化能を評価した。C 末端を切断し Rho1D4 エピトープ配列をつなげたポリプテルス・セネガルス、シベリアアチョウザメ、スポッテッドガー、及びメダカの Opn4 リコンビナントタンパク質をそれぞれ HEK293S 細胞に発現させ、青色光照射を行ったところ、いずれの Opn4 の場合でもイクオリン発光量が光照射後に上昇した (図 4-10)。したがって、条鰭綱のもつ Opn4 は、コードする遺伝子のイントロンの有無に関わらず、いずれも青色光依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を誘導するという共通の分子特性を持っていると考えられる。

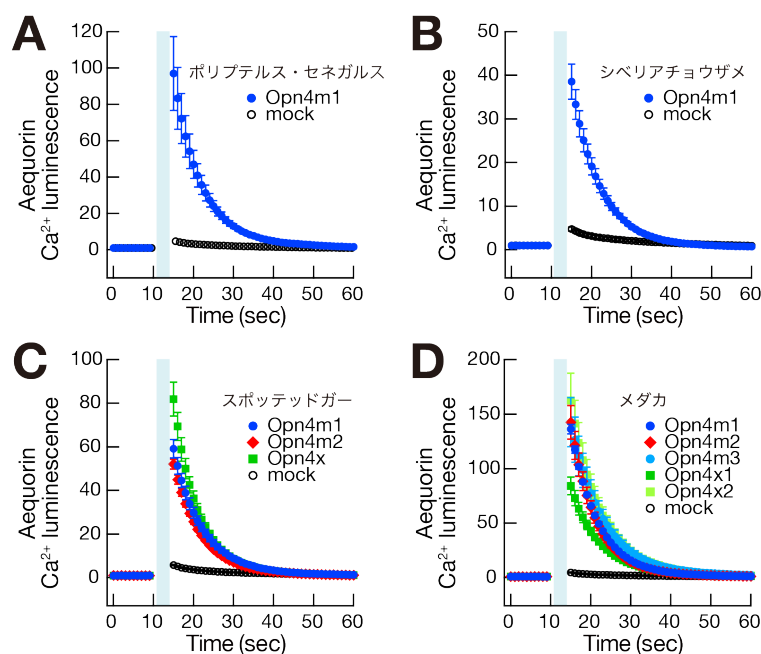


図 4-10 条鰭綱の Opn4 の Gq 型 G タンパク質の活性化能の評価

A-D,ポリプテルス・セネガルス (**A**, Opn4m)、シベリアアチョウザメ (**B**, Opn4m1)、スポッテッドガー (**C**, Opn4m1, Opn4m2, Opn4m3)、及びメダカ (**D**, Opn4m1, Opn4m2, Opn4m3, Opn4x1, Opn4x2) の Opn4 タンパク質による細胞内 Ca^{2+} 濃度の光依存的な変化。 Ca^{2+} 濃度依存的なイクオリンタンパク質の発光量変化は、5 秒間の青色 LED 光 (450 nm) 照射により誘導した。グラフは 2 回の独立の測定データの平均値を示し、算出した標準偏差をエラーバーにより示した。なお、コントロールとしてオプシン遺伝子を導入していない細胞での結果を併せて示した (mock)。

4-2 考察

本章の研究では、条鰭綱の進化過程においてイントロンを含まない *Opn4* 遺伝子がいつ獲得され、重複した *Opn4* 遺伝子がどのように使い分けられてきたのかという多様化過程を明らかにすることを目的とし、条鰭綱のなかで真骨魚類よりも古くに分岐した非真骨魚類（ポリプテルス目、チョウザメ目、及びガー目）並びに真骨魚類の種を対象とした解析を行った。ゲノム情報を用いたシンテニー解析の結果から、intron-less *Opn4m* 遺伝子 (*Opn4m2*) を持つのはチョウザメ目以降の種であり、retroduplication はポリプテルス目の分岐後に起こったと考えられた。また、ガー目と真骨魚類の共通祖先の *Opn4* 遺伝子のレパートリーは *Opn4m1*・*Opn4m2*・*Opn4x* の3種類であったところ、真骨魚類ではさらに全ゲノム重複を経て *Opn4m1* と *Opn4x1* が重複することで、*Opn4m* 遺伝子3種類 (*Opn4m*, *Opn4m3*, *Opn4m2*) と *Opn4x* 遺伝子2種類 (*Opn4x1*, *Opn4x2*) の合計5種類へと *Opn4* 遺伝子のレパートリーが拡大している。タンパク質分子の特性解析の結果から、コードする遺伝子のイントロンの有無に関わらず、条鰭綱の *Opn4* タンパク質はいずれも青色光感受性であり、光依存的に Gq 型 G タンパク質を活性化できるという共通の性質を持つことが分かった。一方 *in situ* hybridization による発現領域解析において、*Opn4m2* 遺伝子は、非真骨類のスポッテッドガーでは網膜の OPL に隣接する一部の細胞のみという極めて限局した発現パターンを示すのに対し、メダカでは脳の前側領域に広く発現し、ゼブラフィッシュでは網膜の水平細胞に強い発現シグナルが検出された。このことから、ガー目の分岐以降の真骨魚類の系統内では、*Opn4m2* 遺伝子の活用範囲が他の *Opn4* 遺伝子よりも拡大している傾向があると考えられる。

なお、*Opn4* 遺伝子の発現パターンには、解析した種間で共通している点も確認できた。例えば網膜においては、解析した全ての条鰭綱の種で OPL に隣接する水平細胞に発現が見られた。このことから、水平細胞での *Opn4* による光受容は、条鰭綱において共通した機能である可能性が示唆される。また脳においても、終脳、間脳、及び中脳の一部の神経細胞に発現が見られた。いくつかの先行研究において、ゼブラフィッシュ幼魚の脳における *Opn4* による光受容が、行動の制御に関わるということが示されている^{86,87}。今後さらに *Opn4* の生理機能との関わりについての解析が進展すれば、条鰭綱において拡大した *Opn4* 遺伝子レパートリーがどのように使い分けられているのかの解明に近づけると期待される。

以上のことを踏まえて、条鰭綱における *Opn4* 遺伝子の多様化の進化モデルを纏めた (図4-11)。条鰭綱の共通祖先は、2種類の intron-containing *Opn4* 遺伝子 (*Opn4m*, *Opn4x*) を持っていたと考えられる。ポリプテルスの分岐後に、*Opn4m* 遺伝子の retroduplication で intron-less *Opn4m* 遺伝子 (*Opn4m2*) を獲得したが、この時点ではこのイントロンを含まない新規遺伝子の利用は極めて限定的であり、主に祖先型のイントロンを含む *Opn4m1* 遺伝子の方が機能していたと考えられる。しかし真骨魚類の共通祖先において、3R WGD によってさらに *Opn4* 遺伝子のレパートリーが拡大するのに加え、種ごとに *Opn4m2* 遺伝子の活用が拡大したと考えられる。

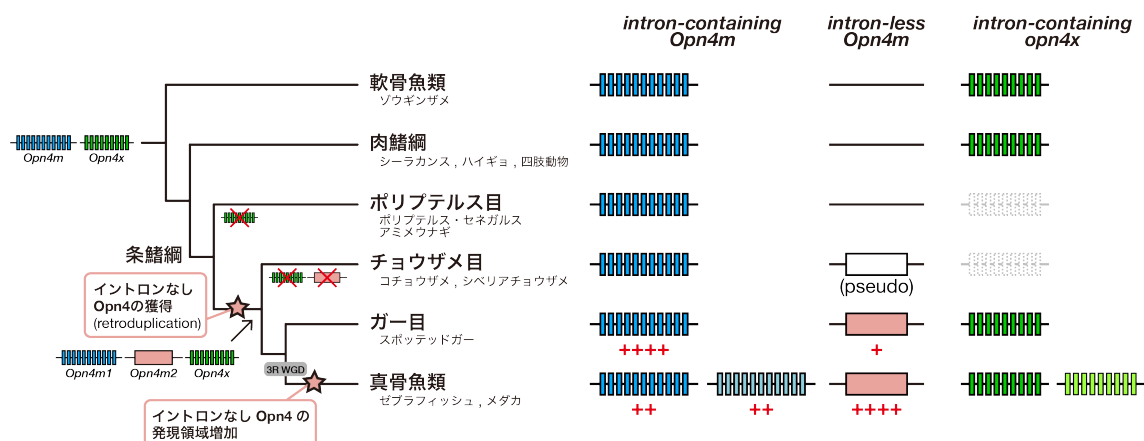


図 4-11 条鰭綱の *Opn4* 遺伝子の多様化過程

条鰭綱の共通祖先は2種類のイントロンを含む *Opn4* 遺伝子 (*Opn4m*, *Opn4x*) を持っていたと考えられる。ポリプテルスの分岐後に、イントロンを含む *Opn4m* 遺伝子の retroduplication によりイントロンを含まない *Opn4m* 遺伝子 (*Opn4m2*) が獲得されたが、チョウザメ目では偽遺伝子化し、ガー目でもこの retrogene の利用は極めて制限されていた。ポリプテルス目及びチョウザメ目では、*Opn4x* 遺伝子もそれぞれ独立に喪失した。一方真骨魚類の共通祖先において、真骨魚類特異的全ゲノム重複によって *Opn4* 遺伝子のレパートリーがさらに拡大するのに加え、*Opn4m2* 遺伝子の利用が種ごとに拡大したと考えられる。

第5章 全体の考察と今後の展望

本研究では、脊椎動物の中で条鰭綱が例外的に持つ、イントロンを含まないロドプシン及び *Opn4* 遺伝子がどのようにして獲得され、使われてきたのかを明らかにするための解析を行った。第3章及び第4章の結果を比較すると、retroduplication による遺伝子重複の時期がいずれもポリプテルス目の分岐後で一致すると考えられる (図 3-17, 図 4-11)。またロドプシンでは、retroduplication で獲得されたイントロンを含まないロドプシン遺伝子は、非真骨魚類ではイントロンを含むロドプシン遺伝子と同じく視覚の光受容体としての機能を担う一方で、真骨魚類では祖先型のイントロンを含むロドプシン遺伝子に代わって視覚の光受容体として機能するようになっていた。イントロンを含まない *Opn4* 遺伝子についても、非真骨魚類では発現が限定的である一方で、真骨魚類では発現量が増加したり発現領域が拡大したりしていた。すなわち、いずれのオプシンにおいても、真骨魚類ではイントロンを含まない遺伝子がコピー元のイントロンを含む遺伝子の機能を代替し活用するという傾向がある。したがって真骨魚類は、条鰭綱の進化の初期に retroduplication により獲得した遺伝子を機能的に活用し、光センサーを多様化させているということが分かった。

条鰭綱において、イントロンを含まないオプシン遺伝子は、ロドプシンと *Opn4* の他にも、グッピー (*Poecilia reticulata*) などが含まれる真骨魚類のカダヤシ目を持つ長波長感受性錐体視物質 (LWS/MWS) の中にも存在する^{27,88}。カダヤシ目の魚は4つの *LWS* 遺伝子 (*LWS-1*, *LWS-2*, *LWS-3*, *LWS-4*) を持つが、そのうちの一つ (*LWS-4*) が、祖先型のイントロンを含む遺伝子から retroduplication により獲得したと考えられる遺伝子である。カダヤシ目 *LWS* のアミノ酸配列を比較すると、181番目のアミノ酸が、グッピーの *LWS-4* ではヒスチジン残基である一方で、シープスヘッドミノー (*Cyprinodon variegatus*) の *LWS-4* ではチロシン残基になっている (図 5-1)³⁰。脊椎動物の *LWS* / *MWS* の多くは181番目にヒスチジン残基を持っているが、この残基は Cl^- イオンを結合することによって λ_{max} を長波長シフトさせ、*LWS* / *MWS* の長波長光 (特に赤色光) 受容に貢献していることがわかっている⁸⁹。また、*LWS* / *MWS* の中でも例外的にマウスなどの齧歯類のものは緑色感受性になっているが、これは181番目にチロシン残基を持つことによって λ_{max} が短波長シフトしたためと考えられている⁹⁰⁻⁹²。このように、齧歯類以外の *LWS* / *MWS* で181番目にチロシン残基を持つものはほとんど見つかっておらず、シープスヘッドミノーの *LWS-4* は齧歯類のものとは独立に181番目にチロシン残基を獲得したと考えられる。このことにより、シープスヘッドミノーは、retroduplication で獲得された *LWS-4* の λ_{max} を、他の3種類の *LWS* (*LWS-1*, *LWS-2*, *LWS-3*) の λ_{max} よりも短波長にシフトさせていると考えられる。このことは、*LWS* レポートリーによる識別可能波長の拡大に寄与していると考えられ、真骨魚類において retroduplication により獲得した遺伝子を機能的に活用しているもう一つの例と言える。

	161		181
			
bovine <i>rhodopsin</i>	WVMALACAAP	PLVGWSRYIP	EGMQCSCGID
human LWS	WIWAAVWTAP	PIFGWSRYWP	HGLKTSCGPD
human MWS	WIWAAVWTAP	PIFGWSRYWP	HGLKTSCGPD
mouse MWS	WVWAAIWTAP	PIFGWSRYWP	YGLKTSCGPD
rabbit MWS	WIWAAVWTAP	PIFGWSRYWP	YGLKTSCGPD
spotted gar LWS	WVWSAGWCAP	PVFGWSRYWP	HGLKTSCGPD
zebrafish LWS-1	WVWAAAWCAP	PIFGWSRYWP	HGLKTSCGPD
zebrafish LWS-2	WVWAAVWCAP	PIFGWSRYWP	HGLKTSCGPD
guppy LWS-1	WVWAAVWCAP	PIFGWSRYWP	HGLKTSCGPD
guppy LWS-2	WVWPAVWCAP	PIFGWSRYWP	HGLKTSCGPD
guppy LWS-3	WVWSAAWCAP	PIFGWSRFWP	HGLKTSCGPD
guppy LWS-4	WVWSAVWCAP	PVFGWSRYWP	HGLKTSCGPD
sheepshead minnow LWS-1	WVWSAVWCAP	PIFGWSRYWP	HGLKTSCGPD
sheepshead minnow LWS-2	WVWPAVWCAP	PIFGWSRYWP	HGLKTSCGPD
sheepshead minnow LWS-3	WVWSAVWCAP	PVFGWSRYWP	HGLKTSCGPD
sheepshead minnow LWS-4	WVWSVVWCAP	PLFGWSRFWP	YGLKTSCGPD

図 5-1 長波長感受性錐体視物質のアミノ酸配列の比較

ウシロドプシン (NCBI accession number: AB062417)、ヒト LWS (NM_020061.6) 及び MWS (NM_000513.2)、マウス MWS (AF011389.1)、ウサギ MWS (NM_001322264.1)、スポッテッドガー LWS (XM_006625291.2)、ゼブラフィッシュ LWS-1 (AF109371.1) 及び LWS-2 (BC076120.1)、グッピー LWS-1 (AB748984.1)、LWS-2 (AB748986.1)、LWS-3 (AB748987.1)、及び LWS-4 (AB748988.1)、並びにシープスヘッドミノールWS-1 (XM_015398975.1)、LWS-2 (XM_015399028.1)、LWS-3 (XM_015398985.1)、及び LWS-4 (XM_015369304.1) のアミノ酸配列を、Clustal W を用いてアラインメントした⁶¹。配列上にウシロドプシンの対応するアミノ酸番号を記し、181 番目のアミノ酸残基を赤字で示した。

また一部の深海に生息する真骨魚類において、intron-less *rhodopsin* 遺伝子をタンデムに多数重複させ、数十に上るロドプシン遺伝子を持つ種が存在する⁹³。脊椎動物において、全ゲノム重複などの特殊な状況を除いてロドプシン遺伝子を重複させている例は稀であり、さらに 10 以上のロドプシン遺伝子を持つ種はこの深海魚以外には報告がない。イントロンを含まないロドプシン遺伝子は、イントロンを含む遺伝子に比べて遺伝子長が短く、ゲノム上で重複させやすかったのかもしれない。以上のように、真骨魚類において retroduplication で獲得したイントロンを含まないオプシン遺伝子を機能的に利用していると考えられる例がいくつか挙げられる。

一方本研究において、いくつかのロドプシン及び *Opn4* 遺伝子が喪失していることも確認できた。例えばチョウザメ目は、ロドプシンについてはイントロンを含む遺伝子を喪失している一方、*Opn4* についてはイントロンを含まない遺伝子を喪失している。シベリアチョウザメの保持する intron-less *rhodopsin* 遺伝子及び intron-containing *Opn4* 遺伝子はいずれも、ポリプテルス・セネガルの持つ祖先型のイントロンを含む遺伝子と比べて、その mRNA の発現分布やそれがコードするタンパク質の分子特性がよく類似していた。このことから、チョウザメ目の 2 種類のロドプシン及び *Opn4* 遺伝子は、遺伝子のエキソン/イントロン構

造は異なるものの機能的に重複しているために、一方の遺伝子をランダムに喪失したと考えられる。また、先述した通り、条鰭綱以外の脊椎動物においてもロドプシン遺伝子を1遺伝子のみ持つものが殆どである。*Opn4* 遺伝子についても、殆どの動物が *Opn4m* 及び *Opn4x* を1遺伝子ずつ持つか、或いは哺乳類の場合はポリプテルス目とチョウザメ目と同様に *Opn4x* 遺伝子を喪失し *Opn4m* 遺伝子が1遺伝子のみとなっている。これらに対し、真骨魚類がロドプシン及び *Opn4* 遺伝子を複数種類保持し、retroduplication によって新規に獲得したイントロンを含まないオプシン遺伝子を機能的に活用する傾向があることは特徴的であると言える。真骨魚類は重複したオプシン遺伝子を活用し、光を用いた未知の機能制御を多様に展開しているのかもしれない。また真骨魚類の共通祖先においては、イントロンの有無が遺伝子発現に影響を与えたために、イントロンを含まないオプシン遺伝子が選択的に利用されるようになったという可能性も考えられる。

なお、条鰭綱のイントロンを含まないロドプシン遺伝子は、retroduplication で獲得した遺伝子であるにも関わらず偽遺伝子化せず、コピー元と同じ網膜で発現する。先行研究において、多くの真骨魚類の intron-containing rhodopsin 及び intron-less rhodopsin 遺伝子上流領域の配列は比較的類似していることが指摘されている⁹⁴。したがって、本来の転写開始点よりも上流から転写が起これ、コーディング領域だけではなく調節領域を含めた形で retroduplication が起こったという可能性が考えられる²⁹。本研究で発現場所を特定したロドプシン遺伝子上流配列を比較すれば、網膜或いは松果体に発現するための調節機構の解明につながる手がかりが得られると期待される。また *Opn4* については、ゼブラフィッシュにおいて各遺伝子上流の配列が異なることが報告されており、*Opn4m2* 遺伝子は retroduplication 後に発現調節領域を再獲得した可能性が示唆されている⁴³。今後、脳や網膜の特定の細胞で遺伝子が発現するための調節メカニズムが解明されれば、真骨魚類の種ごとにおいて、retroduplication で獲得された *Opn4m2* 遺伝子の発現領域をどのように拡大させたかをより詳細に議論できると期待される。

以上本研究により、条鰭綱の進化過程における、retroduplication という珍しい遺伝子重複をきっかけとした2種類のオプシン遺伝子の多様化過程を明らかにすることができた。いずれのオプシンにおいても、条鰭綱の進化の初期に retroduplication によって生じたエキソン/イントロン構造の異なる遺伝子が、真骨魚類の共通祖先の登場まで保存され、その後真骨魚類において発現場所やコードするタンパク質の性質が変化していた。このようなオプシン類の多様化や柔軟な活用は、光受容機能の多様化を可能とし、真骨魚類が様々な水生環境へ適応して著しい種分化を遂げるための基盤となった可能性がある。

謝辞

本論文は、著者の京都大学理学部及び京都大学理学研究科生物科学専攻に在籍中における研究成果をまとめたものです。

同専攻准教授 今元泰先生には、セミナー等の場にてご指導を賜り、常に有益なご助言をいただきました。深く御礼申し上げます。

同専攻講師 山下高廣先生には、実験の初歩のご指導から論文・申請書等の文章執筆の手ほどき、また研究生生活のあらゆる点について熱心で細やかなご指導を賜り、常に適切なご助言をいただきました。深く感謝いたしますとともに、御礼申し上げます。

同専攻研究員 酒井佳寿美博士には、セミナー等の場にて適切なご提案やご助言をいただきました。深く御礼申し上げます。

立命館大学客員教授 七田芳則先生には、ディスカッションを通じてご指導を賜り、様々な知見をご教示いただくとともに、励ましのお言葉をいただきました。深く御礼申し上げます。

岡山大学教授 大内淑代先生、並びに同大学助教 佐藤恵太先生には、共同研究者としてご助言や *in situ hybridization* の手法について細やかなご指導を賜り、様々な知見をご教示いただきました。深く御礼申し上げます。

甲南大学教授 日下部岳広先生、並びに同大学研究員 行者路博士には、共同研究者として適切なご提案やご助言をいただきました。深く御礼申し上げます。

奈良女子大学教授 川野絵美先生には、共同研究者として解剖についてのご助言や様々な知見をご教示いただきました。深く御礼申し上げます。

研究室の学生の皆様には、研究室生活において大変お世話になりました。この場をお借りし、深く感謝申し上げます。

なお本研究は、藤原ナチュラルヒストリー公益財団法人の2020年度(第29回)学術研究助成、及び日本学術振興会の特別研究員奨励費(22J20019, 22KJ1928)の支援のもとに行いました。

参考文献

1. Foster, R. G. & Hankins, M. W. Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog. Retin. Eye Res.* **21**, 507–527 (2002).
2. Pérez, J. H., Tolla, E., Dunn, I. C., Meddle, S. L. & Stevenson, T. J. A comparative perspective on extra-retinal photoreception. *Trends Endocrinol. Metab.* **30**, 39–53 (2019).
3. Terakita, A. The opsins. *Genome Biol.* **6**, 213 (2005).
4. Shichida, Y. & Matsuyama, T. Evolution of opsins and phototransduction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **364**, 2881–2895 (2009).
5. Porter, M. L. *et al.* Shedding new light on opsin evolution. *Proc. Biol. Sci.* **279**, 3–14 (2012).
6. Hofmann, K. P. & Lamb, T. D. Rhodopsin, light-sensor of vision. *Prog. Retin. Eye Res.* **93**, 101116 (2023).
7. Palczewski, K. *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739–745 (2000).
8. Nakanishi, K., Balogh-Nair, V., Arnaboldi, M., Tsujimoto, K. & Honig, B. An external point-charge model for bacteriorhodopsin to account for its purple color. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7945–7947 (1980).
9. Motto, M. G., Sheves, M., Tsujimoto, K., Balogh-Nair, V. & Nakanishi, K. Opsin shifts in bovine rhodopsin and bacteriorhodopsin. Comparison of two external point-charge models. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7947–7949 (1980).
10. Bowmaker, J. K. *et al.* Visual pigments and the photic environment: The cottoid fish of Lake Baikal. *Vision Res.* **34**, 591–605 (1994).
11. Fasick, J. I. & Robinson, P. R. Spectral-tuning mechanisms of marine mammal rhodopsins and correlations with foraging depth. *Vis. Neurosci.* **17**, 781–788 (2000).
12. Hunt, D. M., Dulai, K. S., Partridge, J. C., Cottrill, P. & Bowmaker, J. K. The molecular basis for spectral tuning of rod visual pigments in deep-sea fish. *J. Exp. Biol.* **204**, 3333–3344 (2001).
13. Xia, Y. *et al.* Convergent phenotypic evolution of rhodopsin for dim-light sensing across deep-diving vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* **38**, 5726–5734 (2021).
14. Yokoyama, S. Evolution of dim-light and color vision pigments. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **9**, 259–282 (2008).
15. Davies, W. I. L., Collin, S. P. & Hunt, D. M. Molecular ecology and adaptation of visual photopigments in craniates. *Mol. Ecol.* **21**, 3121–3158 (2012).
16. Nathans, J., Thomas, D. & Hogness, D. S. Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. *Science* **232**, 193–202 (1986).

17. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
18. Palczewski, K. & Kiser, P. D. Shedding new light on the generation of the visual chromophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 19629–19638 (2020).
19. Yau, K.-W. & Hardie, R. C. Phototransduction motifs and variations. *Cell* **139**, 246–264 (2009).
20. Lamb, T. D. Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **36**, 52–119 (2013).
21. Koyanagi, M. & Terakita, A. Diversity of animal opsin-based pigments and their optogenetic potential. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 710–716 (2014).
22. Bellingham, J. & Foster, R. G. Opsins and mammalian photoentrainment. *Cell Tissue Res.* **309**, 57–71 (2002).
23. Tarttelin, E. E., Bellingham, J., Hankins, M. W., Foster, R. G. & Lucas, R. J. Neuropsin (Opn5): a novel opsin identified in mammalian neural tissue. *FEBS Lett.* **554**, 410–416 (2003).
24. Pantzartzi, C. N., Pergner, J. & Kozmik, Z. The role of transposable elements in functional evolution of amphioxus genome: the case of opsin gene family. *Sci. Rep.* **8**, 2506 (2018).
25. Fitzgibbon, J. *et al.* The rhodopsin-encoding gene of bony fish lacks introns. *Gene* **164**, 273–277 (1995).
26. Bellingham, J., Whitmore, D., Philp, A. R., Wells, D. J. & Foster, R. G. Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localisation and phylogenetic position. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **107**, 128–136 (2002).
27. Ward, M. N. *et al.* The molecular basis of color vision in colorful fish: four long wave-sensitive (LWS) opsins in guppies (*Poecilia reticulata*) are defined by amino acid substitutions at key functional sites. *BMC Evol. Biol.* **8**, 210 (2008).
28. Morrow, J. M., Lazic, S. & Chang, B. S. W. A novel rhodopsin-like gene expressed in zebrafish retina. *Vis. Neurosci.* **28**, 325–335 (2011).
29. Kaessmann, H., Vinckenbosch, N. & Long, M. RNA-based gene duplication: mechanistic and evolutionary insights. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 19–31 (2009).
30. Lin, J.-J., Wang, F.-Y., Li, W.-H. & Wang, T.-Y. The rises and falls of opsin genes in 59 ray-finned fish genomes and their implications for environmental adaptation. *Sci. Rep.* **7**, 15568 (2017).
31. Chen, J.-N., Samadi, S. & Chen, W.-J. Rhodopsin gene evolution in early teleost fishes. *PLoS One* **13**, e0206918 (2018).
32. Mano, H., Kojima, D. & Fukada, Y. Exo-rhodopsin: a novel rhodopsin expressed in the zebrafish pineal gland. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **73**, 110–118 (1999).
33. Philp, A. R., Bellingham, J., Garcia-Fernandez, J. & Foster, R. G. A novel rod-like opsin isolated from the extra-retinal photoreceptors of teleost fish. *FEBS Lett.* **468**, 181–188 (2000).

34. Kawano-Yamashita, E. *et al.* Activation of transducin by bistable pigment parainopsin in the pineal organ of lower vertebrates. *PLoS One* **10**, e0141280 (2015).
35. Wurtman, R. J., Axelrod, J. & Phillips, L. S. Melatonin synthesis in the pineal gland: Control by light. *Science* **142**, 1071–1073 (1963).
36. Deguchi, T. Circadian rhythm of serotonin N-acetyltransferase activity in organ culture of chicken pineal gland. *Science* **203**, 1245–1247 (1979).
37. Vigh, B. *et al.* Nonvisual photoreceptors of the deep brain, pineal organs and retina. *Histol. Histopathol.* **17**, 555–590 (2002).
38. Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W. J., Hayes, W. P. & Rollag, M. D. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 340–345 (1998).
39. Provencio, I. *et al.* A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.* **20**, 600–605 (2000).
40. Nayak, S. K., Jegla, T. & Panda, S. Role of a novel photopigment, melanopsin, in behavioral adaptation to light. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 144–154 (2007).
41. Do, M. T. H. & Yau, K.-W. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Physiol. Rev.* **90**, 1547–1581 (2010).
42. Bellingham, J. *et al.* Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *PLoS Biol.* **4**, e254 (2006).
43. Davies, W. I. L. *et al.* Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 4115–4132 (2011).
44. Matos-Cruz, V. *et al.* Unexpected diversity and photoperiod dependence of the zebrafish melanopsin system. *PLoS One* **6**, e25111 (2011).
45. Nelson, J. S., Grande, T. C. & Wilson, M. V. H. *Fishes of the World: Nelson/Fishes of the World*. (John Wiley & Sons, Nashville, TN, 2014). doi:10.1002/9781119174844.
46. Hughes, L. C. *et al.* Comprehensive phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) based on transcriptomic and genomic data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 6249–6254 (2018).
47. Fujiyabu, C. *et al.* Evolutionary history of teleost intron-containing and intron-less rhodopsin genes. *Sci. Rep.* **9**, 10653 (2019).
48. Fujiyabu, C., Sato, K., Ohuchi, H. & Yamashita, T. Diversification processes of teleost intron-less opsin genes. *J. Biol. Chem.* **299**, 104899 (2023).
49. Fujiyabu, C. *et al.* Functional diversification process of opsin genes for teleost visual and pineal photoreceptions. *Cell. Mol. Life Sci.* **81**, 428 (2024).
50. Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193–199 (1991).
51. Molday, L. L. & Molday, R. S. 1D4: a versatile epitope tag for the purification and characterization of expressed membrane and soluble proteins. *Methods Mol. Biol.* **1177**, 1–15 (2014).

52. Motohashi, K. Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) method using cell lysates from laboratory Escherichia coli strains and its application to SLiP site-directed Mutagenesis. *Methods Mol. Biol.* **1498**, 349–357 (2017).
53. Matsuyama, T., Yamashita, T., Imamoto, Y. & Shichida, Y. Photochemical properties of mammalian melanopsin. *Biochemistry* **51**, 5454–5462 (2012).
54. Nakamura, A. *et al.* Chimeric nature of pinopsin between rod and cone visual pigments. *Biochemistry* **38**, 14738–14745 (1999).
55. Tachibanaki, S. *et al.* Presence of two rhodopsin intermediates responsible for transducin activation. *Biochemistry* **36**, 14173–14180 (1997).
56. Bailes, H. J. & Lucas, R. J. Human melanopsin forms a pigment maximally sensitive to blue light ($\lambda_{\text{max}} \approx 479$ nm) supporting activation of G(q/11) and G(i/o) signalling cascades. *Proc. Biol. Sci.* **280**, 20122987 (2013).
57. Sakai, K., Ikeuchi, H., Fujiyabu, C., Imamoto, Y. & Yamashita, T. Convergent evolutionary counterion displacement of bilaterian opsins in ciliary cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **79**, 493 (2022).
58. Morrow, J. M. *et al.* A second visual rhodopsin gene, rh1-2, is expressed in zebrafish photoreceptors and found in other ray-finned fishes. *J. Exp. Biol.* **220**, 294–303 (2017).
59. Nakamura, Y. *et al.* Rhodopsin gene copies in Japanese eel originated in a teleost-specific genome duplication. *Zoological Lett.* **3**, 18 (2017).
60. Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* **8**, 275–282 (1992).
61. Larkin, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948 (2007).
62. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547–1549 (2018).
63. Okano, T., Yoshizawa, T. & Fukada, Y. Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. *Nature* **372**, 94–97 (1994).
64. Frigato, E., Vallone, D., Bertolucci, C. & Foulkes, N. S. Isolation and characterization of melanopsin and pinopsin expression within photoreceptive sites of reptiles. *Sci. Nat.* **93**, 379–385 (2006).
65. Su, C.-Y. *et al.* Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. *Science* **311**, 1617–1621 (2006).
66. Sato, K. *et al.* Pinopsin evolved as the ancestral dim-light visual opsin in vertebrates. *Commun. Biol.* **1**, 156 (2018).
67. Foster, R. G. & Bellingham, J. Inner retinal photoreceptors (IRPs) in mammals and teleost fish. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 617–627 (2004).
68. Sukeena, J. M. *et al.* Characterization and evolution of the spotted gar retina. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* **326**, 403–421 (2016).

69. Omura, Y. & Oguri, M. Histological studies on the pineal organ of 15 species of teleosts. *Nippon Suisan Gakkai Shi* **35**, 991–1000 (1969).
70. McNulty, J. A. & Nafpaktitis, B. G. Morphology of the pineal complex in seven species of lanternfishes (Pisces: Myctophidae). *Am. J. Anat.* **150**, 509–529 (1977).
71. Falcón, J. *et al.* Exposure to artificial light at night and the consequences for flora, fauna, and ecosystems. *Front. Neurosci.* **14**, 602796 (2020).
72. Yokoyama, S. Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Prog. Retin. Eye Res.* **19**, 385–419 (2000).
73. Yokoyama, S. & Takenaka, N. The molecular basis of adaptive evolution of squirrelfish rhodopsins. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 2071–2078 (2004).
74. Tarttelin, E. E. *et al.* Adaptation of pineal expressed teleost exo-rod opsin to non-image forming photoreception through enhanced Meta II decay. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3713–3723 (2011).
75. Asenjo, A. B., Rim, J. & Oprian, D. D. Molecular determinants of human red/green color discrimination. *Neuron* **12**, 1131–1138 (1994).
76. Yokoyama, S., Yang, H. & Starmer, W. T. Molecular basis of spectral tuning in the red- and green-sensitive (M/LWS) pigments in vertebrates. *Genetics* **179**, 2037–2043 (2008).
77. Bi, X. *et al.* Tracing the genetic footprints of vertebrate landing in non-teleost ray-finned fishes. *Cell* **184**, 1377–1391.e14 (2021).
78. Cheng, N., Tsunenari, T. & Yau, K.-W. Intrinsic light response of retinal horizontal cells of teleosts. *Nature* **460**, 899–903 (2009).
79. Naito, T., Nashima-Hayama, K., Ohtsu, K. & Kito, Y. Photoreactions of cephalopod rhodopsin. *Vision Res.* **21**, 935–941 (1981).
80. Ashida, A., Matsumoto, K., Ebrey, T. G. & Tsuda, M. A purified agonist-activated G-protein coupled receptor: truncated octopus Acid Metarhodopsin. *Zoolog. Sci.* **21**, 245–250 (2004).
81. Emanuel, A. J. & Do, M. T. H. Melanopsin tristability for sustained and broadband phototransduction. *Neuron* **85**, 1043–1055 (2015).
82. Sun, L. *et al.* Distribution of mammalian-like melanopsin in cyclostome retinas exhibiting a different extent of visual functions. *PLoS One* **9**, e108209 (2014).
83. Tsukamoto, H. *et al.* Retinal attachment instability is diversified among mammalian melanopsins. *J. Biol. Chem.* **290**, 27176–27187 (2015).
84. Terakita, A. *et al.* Expression and comparative characterization of Gq-coupled invertebrate visual pigments and melanopsin. *J. Neurochem.* **105**, 883–890 (2008).
85. Torii, M., Kojima, D., Nishimura, A., Itoh, H. & Fukada, Y. Light-dependent activation of G proteins by two isoforms of chicken melanopsins. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 1991–1997 (2015).

86. Fernandes, A. M. *et al.* Deep brain photoreceptors control light-seeking behavior in zebrafish larvae. *Curr. Biol.* **22**, 2042–2047 (2012).
87. Dekens, M. P. S., Fontinha, B. M., Gallach, M., Pflügler, S. & Tessmar-Raible, K. Melanopsin elevates locomotor activity during the wake state of the diurnal zebrafish. *EMBO Rep.* **23**, e51528 (2022).
88. Chang, C.-H. Correlated expression of the opsin retrogene LWS-R and its host gene in two poeciliid fishes. *Zool. Stud.* **61**, e16 (2022).
89. Wang, Z., Asenjo, A. B. & Oprian, D. D. Identification of the Cl(-)-binding site in the human red and green color vision pigments. *Biochemistry* **32**, 2125–2130 (1993).
90. Sun, H., Macke, J. P. & Nathans, J. Mechanisms of spectral tuning in the mouse green cone pigment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8860–8865 (1997).
91. Davies, W. I. L., Wilkie, S. E., Cowing, J. A., Hankins, M. W. & Hunt, D. M. Anion sensitivity and spectral tuning of middle- and long-wavelength-sensitive (MWS/LWS) visual pigments. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 2455–2464 (2012).
92. Yamashita, T., Nakamura, S., Tsutsui, K., Morizumi, T. & Shichida, Y. Chloride-dependent spectral tuning mechanism of L-group cone visual pigments. *Biochemistry* **52**, 1192–1197 (2013).
93. Musilova, Z. *et al.* Vision using multiple distinct rod opsins in deep-sea fishes. *Science* **364**, 588–592 (2019).
94. Asaoka, Y., Mano, H., Kojima, D. & Fukada, Y. Pineal expression-promoting element (PIPE), a cis-acting element, directs pineal-specific gene expression in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15456–15461 (2002).