

## 変異錐体オプシンを発現するトランスジェニックイモリ作製の試み

高津光平 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 櫻井啓輔 (筑波大学 生命環境系)

## 背景および目的

脊椎動物の網膜には明るい所での視覚に関わる錐体細胞と暗い所での視覚に関わる桿体細胞の2種類の視細胞が存在する。これらの細胞は機能する光環境の違いにより、錐体視細胞では色の認識に関与し高解像度を持つものに対して、桿体視細胞では高い光感度を持つという異なった光応答特性を示す。これらの細胞の光受容に関わるタンパク質を比較すると、それぞれ異なる遺伝子グループに属するタンパク質で構成されていることが知られている。このことから、これらの視細胞は共通の祖先となる視細胞から派生し光環境へ対応していく中で、異なる光応答特性を獲得してきたと考えられている。先行研究によると、桿体光受容タンパク質であるロドプシンは4種類ある錐体光受容タンパクグループの一つのグループよりも約1,000倍も熱的に安定しており (Sakurai *et al.*, 2007)、この光受容タンパクの高い熱安定性は暗所における視覚に重要であると考えられている。本研究では、このような桿体と錐体の光受容タンパク質の分子的性質の違いに関わるアミノ酸残基を明らかにすることを旨とする。この目的のために、熱安定性に関わると考えられるアミノ酸残基の変異を導入した錐体光受容タンパクを桿体細胞に異所発現するトランスジェニック動物を作製し、電気生理学的手法を用いて導入タンパクの性質を解析する。

本研究ではまず、アミノ酸に変異を加えた錐体光受容タンパク質を桿体細胞に異所発現させるのに必要なベクターを設計し、そのベクターを用いてトランスジェニックイモリの作製を試みた。

## 材料と方法

## 1) コンストラクト作製

ベクターのコンストラクトは、導入DNA配列とその両端に連結したメガヌクレアーゼ *I-SceI* 認識配列で構成される。導入DNA配列は上流から、全身性に働く CAG プロモーター配列、変異ヒト赤錐体オプシン (hRed opsin) 遺伝子、リボソームをリクルートし翻訳を開始させる機能を持つ IRES (Internal Ribosome Entry Site) 配列、蛍光タンパク質 mCherry 遺伝子配列、SV40 ポリ A 付加配列の順に連結し、この配列を *I-SceI* 認識配列で挟むようにコンストラクトを構築した。このようなコンストラクトを作製した場合、IRES 配列下流の mCherry の蛍光シグナルの有無が、トランスジェニック体の選別マーカーとなる。

## 2) トランスジェニック体の作製

受精卵採取の為のイモリは 18°C の恒温条件下で 60 L の水槽に飼育した。イモリに生殖腺刺激ホルモンを定期的に注射することにより産卵を促し交配させた。得られた1細胞受精卵を2% チオ硫酸ナトリウム溶液で脱ゼリー処理した後、6% Ficoll 溶液を入れた96穴プレートに移し、1つの受精卵につきコンストラクトDNA溶液4nLをマイクロインジェクターで注入した。コンストラクトDNAの最終濃度は0.02 µg/µL または0.2 µg/µL となるように調製した。この溶液には *I-SceI* が含まれており、37°C で40

分間インキュベート処理によって *I-SceI* 認識配列が切断されて、目的の配列が遺伝子に組み込まれるようになる。インジェクションしたイモリ卵は14°Cで飼育した。インジェクション後2日経過した卵の内、胞胚期まで正常に発生した胚を選別し、アガロースでコートしたディッシュで飼育した。イモリ胚における蛍光タンパクの発現の有無は、神経胚以降の個体を実体蛍光顕微鏡で観察した。なお、これらのトランスジェニックイモリ作製の手順に関しては千葉研究室の先行研究 (Casco-Robles *et al.*, 2010) に従った。

## 結果

平均61個の受精卵にインジェクションを行った。またインジェクション後に正常に発生した卵は平均22個だった。ベクターDNAは、低濃度と高濃度の異なる条件で受精卵に注入し、その導入効率を選別マーカー mCherry の発現を指標として比較した。その結果、低濃度 DNA 条件においては mCherry の蛍光が観察された個体はほとんど得られなかったのに対して、高濃度 DNA 条件においてはインジェクション後に正常発生した卵の内、約50%の胚において mCherry の蛍光が確認された (Fig. 1)。

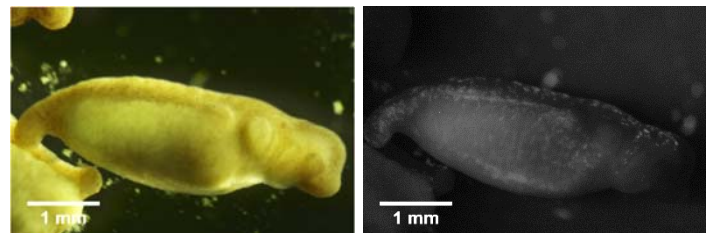


Fig. 1: イモリ尾芽胚 (左) における mCherry の蛍光画像 (右)

## 考察・今後の展望

今回の結果では、遺伝子導入効率は注入した DNA 量に大きく影響を受けた。今後は高い導入効率を得られた条件を用い、トランスジェニック体の作製を進めて行く予定である。また mCherry の蛍光シグナルが確認されたことから、トランスジェニック体は機能性タンパク質である錐体オプシン遺伝子の発現も期待できる。今後の研究では、網膜での錐体オプシンの遺伝子の発現について生化学的手法を用いて調べると共に、錐体オプシンが異所発現する桿体細胞の応答特性について電気生理学的手法を用いて解析する予定である。

## 参考文献

- (1) Sakurai K *et al.* 2007. Physiological properties of rod photoreceptor cells in green-sensitive cone pigment knock-in mice. *J Gen Physiol* 130:21-40.
- (2) Casco-Robles MM *et al.* 2010. Simple and efficient transgenesis with *I-SceI* meganuclease in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Dev Dyn* 239:3275-3284.