

## 光受容細胞で遺伝子を特異的に発現させるメカニズムの解明

石塚 絢子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 笹倉 靖徳 (筑波大学 生命環境系)

### 背景・目的

光受容細胞は光の感知に特化した神経細胞であり、外部からの情報を伝達することに特化した細胞である。形態的にも機能的にも特化した神経細胞である光受容細胞の分化機構を解明することは、多様な神経細胞が産み出されるメカニズムを解明するための良いモデルとなる。

脊索動物ホヤの1種であるカタユレイボヤ *Ciona intestinalis* は幼生期にはオタマジャクシ型の形態をしており、脳内に色素細胞が付随した2つの感覚器官、眼点と平衡器を有している。形態学的、生理学的な研究から、眼点は光受容に、平衡器は重力感知に関与することが明らかとなっている。変態後は岩などに固着しほぼ動かないが、幼生期には遊泳生活を送る。ホヤ幼生の光に対する行動は詳細に調べられており、明刺激後の暗刺激に対して遊泳運動を開始し、暗刺激後の明刺激に対して遊泳行動を停止させることが明らかとなっている。このホヤ幼生の光に対する行動には、カタユレイボヤオプシン1遺伝子 (*Cropsin1*) が必須の役割をしており、*Cropsin1* の機能を阻害すると光応答は完全に消失する。*Cropsin1* の発現パターンの解析から、ホヤ幼生の脳内には *Cropsin1* を発現する2種類の光受容細胞、眼点光受容細胞と眼点外光受容細胞が存在しており、このうち眼点光受容細胞がホヤ幼生の光に対する行動を制御している。このように *Cropsin1* を発現する光受容細胞に関する生理機能は明らかになりつつあるが、*Cropsin1* を発現する光受容細胞の分化機構、および *Cropsin1* を光受容細胞に特異的に発現させるメカニズムは不明である。そこで本研究では、*Cropsin1* の発現調節領域の解析を行い、*Cropsin1* の光受容細胞に特異的なシスエレメントの同定を試みた。さらに、ホヤ幼生の光に対する行動を制御する神経回路を明らかにすることを目的として、光受容細胞で特異的に経シナプストレーサーを発現させ、組織学的な解析を行うことにより、光受容細胞を起点とする神経回路の解析も行った。

### 材料・方法

#### (1) *Cropsin1* の発現調節領域の解析

*Cropsin1* の開始 Met から上流 (5'領域) 約 5kb を単離し、蛍光タンパク質 Kaede と連結させたコンストラクトを作製した。エレクトロポレーション法により、ホヤ受精卵へと遺伝子導入を行い、幼生期 (受精後 22 時間) に Kaede の蛍光パターンの観察を行った。次に、段階的に上流領域を 5'側から削ったコンストラクトを作成した。新たに作製したコンストラクトについても同様にエレクトロポレーション法により、ホヤ卵へと遺伝子導入を行い、Kaede の蛍光パターンの解析を行った。さらに推定される転写因子結合配列に変異を入れたコンストラクトを作製した。

#### (2) 光受容細胞を起点とした神経経路の解析

同定した光受容細胞特異的な遺伝子発現調節領域を用いて、経シナプストレーサー WGA (小麦胚芽レクチン) および蛍光タンパク質 CFP を光受容細胞で特異的に発現するコンストラクトを作

製した。作製したコンストラクトをエレクトロポレーションによってホヤ受精卵へと導入し、幼生期 (受精後 22 時間) にホルマリリンにより固定を行った。固定したサンプルは抗 WGA 抗体、抗 GFP 抗体を用いて、免疫染色を行った。

### 結果・考察

#### (1) *Cropsin1* の発現調節領域の解析

*Cropsin1* の開始 Met から上流約 5 kb を Kaede と連結させたコンストラクトを導入したところ、Kaede の蛍光は眼点光受容細胞と眼点外光受容細胞の 2 か所で観察された。したがって、*Cropsin1* の開始 Met から上流 5 kb に光受容細胞に特異的なシスエレメントが含まれていることが確認された。次に上流領域を 5'側から 400 bp、350 bp、300 bp、250 bp、200 bp、150 bp、100 bp と段階的に 50 bp ずつ欠失させたコンストラクトを導入したところ、上流 250 bp から段階的に Kaede の発現率は低下し、上流 150 bp ではほぼ Kaede の発現は消失した。したがって *Cropsin1* の光受容細胞特異的なエンハンサー領域は開始 Met から上流 300 bp から 150 bp の間に複数箇所存在することが示唆された。この上流 300 bp から 150 bp の範囲に存在する転写因子の結合配列を調べたところ、Otx、Homeobox、bHLH、Fox などの結合配列が存在していることが明らかとなった。したがって、*Cropsin1* の光受容細胞特異的な発現はこれらの転写因子によって誘導されると考えられる。カタユレイボの眼点の分化にはホメオボックス型転写因子 Rx が重要な役割を担っており、また、多くの動物において Otx が光受容細胞の分化に必須の役割をすることが知られている。今後は、これらの転写因子の機能阻害実験、過剰発現実験により、これらの転写因子が光受容細胞の分化における役割を明らかにしたい。一方で、今回の実験では眼点光受容細胞と眼点外光受容細胞を明確に区別するシスエレメントは同定することは出来なかったが、さらに詳細な解析を行うことで、眼点光受容細胞と眼点外光受容細胞をそれぞれ区別することが出来ると期待される。

#### (2) 光受容細胞を起点とした神経経路の解析

WGA 抗体で染色を行った結果、光受容細胞特異的に WGA を発現させることには成功したが、今回の実験では期待したような 2 次ニューロン以降への WGA の輸送は確認することが出来ず、光受容細胞を起点とした神経経路を同定することが出来なかった。今後、いくつかの条件を検討することにより、光受容細胞を起点とする神経経路を同定したいと考えている。