

## マウス桿体視細胞におけるホヤオプシンの機能解析

本間 龍之輔（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）

### 【導入】

脊椎動物の網膜には、暗所での光受容に機能する桿体視細胞と明所での光受容に機能する錐体視細胞が存在する。これら視細胞では、発色團レチナールとタンパク質であるオプシンからなる視物質が光受容すると、細胞内シグナル伝達過程を介して光応答が生じる。脊椎動物の網膜視細胞は高い光感受性をもつが、これはオプシンが視細胞の光受容部位である外節に高密度に局在しているのに加え、光異性化した視物質が高効率にシグナル伝達系を活性化することができることに起因している。このような特性はオプシンファミリーの中でも、視覚を担うオプシン類に特有の性質であることから進化の過程で獲得されたものと考えられる。

ホヤは脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物として知られ、その幼生は脊索や神経管を持つなどの脊椎動物の特徴を有することから、脊椎動物の進化を考える上でよく利用される。ホヤ幼生には光受容の器官である眼点にはレンズと纖毛型視細胞があり、明暗条件の変化より起きる遊泳行動に関与することが知られている。眼点の視細胞にはホヤオプシン Ci-opsin1 が発現している。ホヤの Ci-opsin1 は脊椎動物の視細胞のオプシン類に近縁であり、吸収極大波長など機能的に類似する点も多い。脊椎動物に近縁であるホヤが持つ Ci-opsin1 の機能解析は、脊椎動物のオプシンの特性がどのような過程で形成されたかを探る上で重要である。このような観点から、Ci-opsin1 を脊椎動物のオプシンと生理的条件下で比較することを試みた。

本研究では、ホヤの一種のカタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) のオプシンである Ci-opsin1 をマウスの桿体視細胞に発現させ、電気生理学的に機能を解析することで、脊椎動物の視細胞外節へのオプシンの輸送及びシグナル增幅効率におけるオプシンの進化的意義を明らかにすることを目指し実験を行った。

### 【材料と方法】

#### (1) マウス網膜における生体内ゲノム編集

マウスの網膜に対して、*in vivo* エレクトロポレーション法によって遺伝子導入を行った。Ci-opsin1 遺伝子のドナーベクターに加え、Cas9 及びガイド RNA ベクターを導入した。ドナーベクターには、Ci-opsin1 遺伝子、内部リボソームの結合サイト IRES、赤色蛍光タンパク質 mCherry の配列を順に結合させた。これらの配列が Cas9 とガイド RNA を介してマウスロドプシン遺伝子座に部位特異的に挿入される。部位特異的なゲノム編集が行われた細胞では、mCherry の蛍光が確認される。なお、Ci-opsin1 遺伝子はホヤの幼生から RNA を抽出し クローニングをおこなった。

マウスは、ICR 系統の雌雄を問わず用いた。生後 24 時間以内のマウスの瞼を麻酔下で切開し、露出した眼球の角膜に穴を開け、プラントエンド針を網膜と強膜の間まで挿入し、プラスミドベクターを含む PBS 溶液 (終濃度 5 µg/µL) を 0.5 µL 注入した。注入した眼を陽極側にしてエレクトロポレーターで電気刺激を与えた後を網膜神経細胞に導入した。これにより、マウスの桿体視

細胞のオプシンをノックアウトし、Ci-opsin1 を発現させることが可能になる。

#### (2) 免疫組織化学

遺伝子導入を行ったマウスが成体になった後 (5~6 週齢) に、インジェクションを行った眼球を摘出し、実体顕微鏡下で mCherry の蛍光が確認された眼球をスクリーニングし、20 µm の組織切片を作成した。この切片に対して、10% 正常ヤギ血清/PBS でブロッキングを行い、一次抗体として抗ロドプシン抗体及び抗 Ci-opsin1 抗体を処理し、二次抗体溶液を処理した。その後 DAPI による核染色を行い、倒立型蛍光顕微鏡 (Olympus 社 IX83) により蛍光観察を行った。網膜はバックグラウンドが高い組織であるため、マウス網膜アセトンパウダーによる処理を抗 Ci-opsin1 抗体を含む血清に行い Ci-opsin1 への抗体の特異性を高めた。

### 【結果と考察】

網膜切片の蛍光観察より、全身性の CAG プロモーターにより EGFP を発現するベクターを合わせて遺伝子導入を行った場合には、EGFP の蛍光は桿体視細胞以外の内顆粒層の双極細胞にも確認されたが、mCherry の蛍光は視細胞層にのみ確認された。このことから、導入したドナーべクター配列はロドプシンの遺伝子座に部位特異的に挿入されているといえる。

また、mCherry が発現する桿体視細胞において外節の形成が確認された (図 1)。オプシンが発現していない桿体視細胞では外節は正常に発達しないが、mCherry が発現する桿体視細胞の形態観察から外節の形成が確認されたことから、観察した桿体視細胞では Ci-opsin1 が発現し、外節に正常に輸送されていることが示唆される。抗体を用いた免疫染色では桿体視細胞における Ci-opsin1 特異的な蛍光は現時点では確認できていないが、染色条件の検討を行っている。

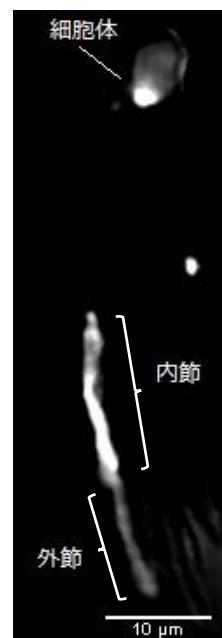


図 1 mCherry が発現する桿体視細胞

### 【展望】

mCherry 陽性の桿体視細胞の外節の形成が観察されたことから、導入した Ci-opsin1 が発現し外節への輸送が適切に行われていることが示唆される。免疫染色条件の検討することで外節における発現を確認したい。また、mCherry 陽性桿体視細胞において、部位特異的遺伝子改変の遺伝子型を調べることが必要である。そのため、mCherry 陽性桿体視細胞に対して 1 細胞 RT-PCR を行うことでゲノムの遺伝子型を調べていく予定である。さらに、パッチクランプ法などの電気生理学的手法を用い、Ci-opsin1 を発現する細胞の生理機能を明らかにしたい。