

マウス脳に発現する光受容体の機能解析

脇田 一樹 (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】

我々は、外界の知覚や記憶の大部分を視覚に依存している。多くの脊椎動物は眼の網膜に存在する視物質を受容体として光を受容し電気エネルギーに変換し、視覚情報として利用している。視物質は補因子レチナールとオプシンというタンパク質で構成される。オプシンの中でもロドプシンが広く知られているが、1999年にマウスの小脳での存在が報告されたオプシン 3 (エンセファロプシン) という新規オプシン遺伝子は、眼以外の組織で発現がみられることから、非視覚的な光情報の利用に関与している可能性が示唆された。哺乳類における非視覚型のオプシンとしては、瞳孔反射や概日リズムの光同調にかかわるオプシン 4 (メラノプシン) が精力的に研究されその機能の詳細が知られているが、オプシン 3 については魚類や昆虫、環形動物での発現が報告されその分子特性が明らかにされているものの、その生体における機能については、いまだ不明な点が多い。マウス脳におけるオプシン 3 の生理機能を明らかにするためには、脳スライス標本のオプシン 3 を発現する細胞に対して暗条件下でパッチクランプ法を行い、光応答を電気生理学的に測定するのが有用であると考えられる。

そこで本研究では、まず、オプシン 3 の発現が比較的広範囲にみられるマウスの小脳において、その生理学的役割を検証する目的で、小脳スライス切片を作製し電気生理学的測定を行った。

また、オプシン 3 が発現する割合が少ない部位においても、細胞を同定し電気生理測定を可能にするためには、オプシン 3 陽性の細胞を蛍光タンパク質で標識させる必要がある。そこで、オプシン 3 の上流配列に蛍光タンパク質をつなげたベクターをエレクトロポレーション法でマウス脳へ導入することを試みた。

【材料と方法】

スライス標本の作製

マウスの非近交系 ICR マウス成体を頸椎脱臼し、頭蓋骨を切開して小脳を摘出した。脳は、酸素 95%-二酸化炭素 5% で平衡化した 4°C の Modified Ringer 溶液 (Choline Chloride 120 mM, KCL 3 mM, MgCl₂ 8 mM, NaHCO₃ 28 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, Glucose 25 mM) で満たされたチャンバーに移し、振動刃マイクローム (Campden instrument, 5100mz) を用いて 250 μm のスライス標本を作成した。スライス標本は酸素 95%-二酸化炭素 5% で平衡化した 30°C の Normal Ringer 溶液 (NaCl 125 mM, KCL 2.5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 8 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, Glucose 11 mM) 中で 30 分間培養した後に使用した。

スライス標本への遺伝子導入

遺伝子導入は 1 μg/μL の DNA を含む HBSS 溶液に入れたスライス標本を、両側を円形電極 (直径 5 mm) で挟み、エレクトロポレーション装置 (ネッパジーン, NEPA21) を用いて行った。電気刺激は 10~15 V、5 ms の矩形パルスで正負の極性で 5 回ずつ与えた。エレクトロポレーションを行ったスライス標本は 1 晩培養し、蛍光顕微鏡を用いて蛍光観察を行った。CAG プロモーター

に EGFP 遺伝子をつなげたベクター及びオプシン 3 遺伝子の 5' 上流配列と蛍光タンパク質を結合したベクターを構築した。

ホールセルパッチクランプ法

作製したスライス標本に対して、ホールセル/穿孔パッチクランプ法を利用して電気生理学的解析を行った。パッチクランプの記録電極に使用したガラス管は電極ブラー (Sutter instrument, P-97) を用いて、電極の抵抗値が 8~15 MΩ ほどのものを作製した。マニピュレータを操作して、記録電極を IR-DIC 可視化した細胞体に近づけた。記録電極内には K⁺電極内用液 (K-gluconate 112 mM, K₂SO₄ 10 mM, HEPES 5mM, KCl 15 mM, NaCl 10 mM, MgATP 4 mM, Na₃GTP 0.3 mM, pH 7.2) に β-escin を加えた溶液を満した。増幅器 (Axopatch200B) で記録したデータは、AD コンバーター (Digidata1322) で変換した後パソコンのソフトウェア (pClamp9.2) で取得した。観察の際、スライス標本はガラスボトムディッシュに入れて正立顕微鏡のステージに固定し、酸素 95%-二酸化炭素 5% で平衡化した Normal Ringer を灌流させた。

【結果と展望】

小脳組織においてオプシン 3 陽性の細胞の標識することを目指し、遺伝子導入の条件の確立を行った。まずエレクトロポレーション法による遺伝子導入効率を評価するために、CAG-EGFP プラスミドを用いて、小脳組織に対して遺伝子導入を行った。小脳スライス標本を蛍光顕微鏡で観察した結果、スライス標本の一部の領域において蛍光が観察された。適切に遺伝子導入され、蛍光タンパク質を発現させることが出来たため、引き続き構築中のオプシン 3 上流配列のプロモーター組み込んだベクターを小脳組織へ導入することを試みる。また、小脳スライス標本に対して、穿孔パッチクランプを用いて電気生理学的測定を行った。試みた細胞から光応答の取得には至っていない。現在、より多くの細胞が生理的な活性を保持した状態で測定を行えるように、スライス標本の作製条件の再検討をおこなっている。研究発表会において、その研究成果を報告する予定である。