

錐体オプシンを桿体様に変換するノックインマウス作製へのアプローチ

武生 朋佳 (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)

【背景と目的】

脊椎動物の眼には、桿体と錐体の2種類の光受容細胞がある。桿体は暗い環境で少ない光に高感受性を示し、錐体は明るい環境で高解像度の色の識別を行う。これらの光受容細胞は異なるオプシタンパク質が発現している。生化学的な研究によって、桿体のオプシン(ロドプシン)と錐体オプシンは高い相同性を持つが、分子特性が異なることが知られている。ロドプシンは錐体オプシンよりはるかに熱的な安定性を示し、桿体が自発的なバックグラウンドノイズを低減させ、暗闇で少ない光子を検出するために必要な性質を持つ。一方で、錐体オプシンは、光活性化状態である Meta II 中間体の不活性化やレチナル再生速度が、ロドプシンに比べて速いことが知られている。この分子特性は、錐体がより高い強度の光環境下でも視物質を飽和させることなく視覚を維持できるという生理機能に関与する可能性が示唆されている。このようなロドプシンと錐体オプシンの分子特性の違いは、主に189位のアミノ酸残基が担っていることが知られている。

研究の最終目的は、オプシンの分子特性が錐体の光応答特性や順応などの視覚機能にどのように関与するかを明らかにすることである。その目的のため、錐体オプシンの分子特性を桿体様に変化させたマウスの作製を行い、電気生理学的手法を用いて生理機能を解析する。本研究では、マウスの錐体オプシンを桿体様に変化させるため、ゲノム編集法により錐体オプシンに189位のアミノ酸変異が導入されたノックインマウスの作製を試みた。

【方法】

・ノックインマウスの作製

本研究では、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いてマウスの錐体オプシンにアミノ酸変異が導入されたノックインマウスを作製した。マウス錐体オプシンの189位をプロリンからイソロイシンに置換するにあたって、ドナーDNAとなる160baseのsingle strand oligo nucleotide (ssODN)を設計した。ssODNには189位のアミノ酸置換のための3塩基変異に加え、gRNA認識配列に3か所のサイレント変異を挿入した。これは挿入された配列がCas9ヌクレアーゼにより再切断されることを防ぐためであり、また制限酵素 Cla Iにより遺伝子型解析を容易にするためであった。さらに Cas9 ヌクレアーゼによって部位特異的に切断するために、ターゲット領域の配列情報から gRNA を設計した。これらの ssODN、gRNA、および Cas9 ヌクレアーゼを含むゲノム編集溶液を、i-GONAD 法に従い妊娠 0.7 日目の雌マウスの左右の卵管に直接注入し電気穿孔処置を行った。処置を行った妊娠マウス 10 匹の内、5 匹から計 47 匹の仔マウス(F0 マウス)を得た。さらにその F0 マウスと野生型 C57BL/6 マウスとの交配によって、得た 2 系統のマウスを樹立し解析に用いた。

・免疫組織化学

マウス眼球を 4%パラホルムアルデヒド固定し凍結切片を作製した。マウス錐体オプシン N 末端認識する抗体を用い抗体免疫染色(蛍光抗体法)を行い、蛍光観察を行った。

・網膜電図(ERG)の記録

実験前にマウスを一晩暗順応させた。麻酔下のマウスの角膜に記録電極および口腔内に不関電極を設置し、 Ganzfeld ドームを介して単色光(505nm)を眼に与え、発生する光応答を記録した。

・転写産物の解析

マウスの網膜から調整した total RNA に対して、オリゴ dT プライマーを用いて cDNA を合成し、錐体オプシンに特異的なプライマーを用いて PCR を行った。

【結果】

ゲノム編集法によって得られた仔マウス 47 匹の遺伝子型を調べるために、標的遺伝子のゲノム領域を PCR 増幅し、Cla I 酵素処理により変異導入の確認を行った。その結果、17 匹のマウスで標的遺伝子における ssODN の組換えが確認された。さらに DNA シークエンスによって塩基配列を確認し、適切に塩基置換された 7 系統のマウスの樹立に成功した。

樹立したノックインマウスのうち 2 系統について、導入した錐体オプシンがマウス錐体で正常に発現しているかを調べるために、網膜の免疫染色を行った。その結果、野生型では錐体の外節部にオプシンが局在していたのに対して、ノックインマウスのホモ接合体では錐体の外節部に蛍光シグナルが確認されなかった。

さらに ERG 実験によって、ノックインマウス網膜の光応答を計測した。その結果、野生型に見られる錐体に特徴的な応答の波形が、ノックインマウスではほとんど見られないことが分かった。以上のことから、ノックインマウスの錐体オプシンは遺伝子の転写または翻訳の過程で異常がみられる可能性が考えられた。

次に錐体オプシンの転写産物を解析するために、マウスの網膜における錐体オプシン遺伝子の転写産物の長さを電気泳動により調べたところ、ホモ接合体においては野生型に比べて約 150 bp 短い mRNA が転写していることが分かった。さらに、錐体オプシン遺伝子の転写産物のシークエンス解析を行った結果、変異を導入した錐体オプシン遺伝子の転写産物はエキソン 4 領域が完全に欠失していることが分かった。

【考察と展望】

本研究では、ゲノム配列では目的の変異が錐体オプシン遺伝子に導入されたノックインマウスの作製に成功したが、予期しない変異効果により転写産物やタンパク質が適切に合成されていないことが判明した。先行研究においてマウス網膜に錐体オプシン変異体を一過性発現させた場合は、タンパク質は外節部への輸送が正常に行われていたため、転写産物が適切にスプライジングされず異常な mRNA が合成されていると考えられる。

現在、スプライジングに関わる配列や機構等は未だ解明されていないことが多いが、「挿入する塩基配列を同義コドンに替える」「再切断を防ぐために挿入したサイレント変異の位置を変更する」などの新たな ssODN を設計して、網膜上で錐体オプシンを正常に発現させる新規のノックインマウスの作製を試みている。