ゼブラフィッシュ緑型視物質遺伝子の Remote Regulatory Region の機能解析及び
赤型視物質遺伝子の転写制御領域同定に向けたレポーター遺伝子発現コンストラクトの作製

36533 人類進化システム分野　辻村太郎

[背景と目的]

色覚は外界の識別を行うのに重要な感覚で、その機能は生物の生態と密接に関わりながら進化してきたと考えられる。明所で色識別を担う錐体オプシンは、進化系統学的に SWS1 (紫外型)、SWS2 (青型)、RH2 (緑型)、M/LWS (赤型)の 4 種類のグループに分類される。色覚が成立するためには、それら複数の錐体オプシンを持つことに加えて、１つの錐体視細胞に１種類のオプシンのみを特異的に発現することが必要である。生物の色覚機能の進化を考える時に、この１視細胞 1 視物質という発現制御機構の解明は重要であるが、まだほとんど明らかとなっていない。

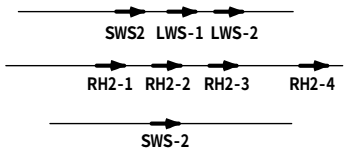

図1 ゼブラフィッシュ全錐体視物質遺伝子のゲノム構造

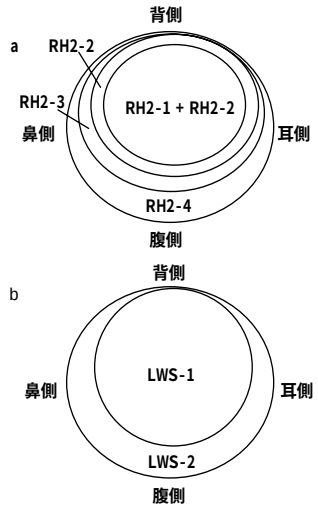

図2 ゼブラフィッシュ成魚網膜におけるRH2(a)およびLWS(b)サブタイプ遺伝子の発現分布

水中の光環境は、深さや濁度といった陸上にはないパラメータの存在により多様であり、それに適応した結果として魚類は高度な色覚系を備えている。魚類は一般に 4 グループ全ての錐体オプシン遺伝子を持ち、形態の異なる 4 種類の錐体視細胞がそれぞれ 1 種類のオプシンのみを特異的に発現させている。また、興味深いことに魚類の各オプシン遺伝子グループは重複により生じたサブタイプを有することがある。ゼブラフィッシュでは、RH2 として RH2-1～4 の４種類のサブタイプが、LWS として LWS-1 及び LWS-2 の２種類のサブタイプが存在する（図１）。それらの遺伝子はサブタイプ間で光吸収特性が異なり、また図２に示すように網膜中の発現領域も時間的・空間的に明確に異なる。このような機能分化は、魚類の生息する環境と強く結びついていると考えられる。特にそれらの発現制御機構は、この機能分化の過程に重要な役割を果たしていると考えられ、その解明は興味深い問題である。そこで私はゼブラフィッシュ錐体オプシン遺伝子 RH2 及び LWS の発現制御機構の解明に取り組むことにした。ゼブラフィッシュの RH2 遺伝子は、４種類の錐体視細胞のうち short members of double cone (SDC)で特異的に発現し、LWS 遺伝子は long members of double cone(LDC)で特異的に発現する。当研究室および海外の研究グループにより RH2、LWS 各遺伝子の上流域を GFP（緑色蛍光タンパク質）遺伝子につなげたレポーターコンストラクトをトランスジェネシスによりゼブラフィッシュに導入する実験が行われたが、これまで各オプシン遺伝子の発現を再現できていなかった。

<u>RH2 について</u>

当研究室で RH2-1 の上流 15kb に位置する 0.5kb の RH2-Remote Control Region (RH2-RCR)が同定され、それを RH2-1 または RH2-2 の直上プロモーター配列に付加することで、その下流につなげた GFP 遺伝子の SDC における特異的な発現を誘導できることが明らかにされている。しかし、RH2-RCR の RH2-3 および RH2-4 に対する影響は同様の実験では明らかになっていなかった。また、RH2-1 と RH2-2 についても、RH2-RCR が生体内で実際に必要な領域

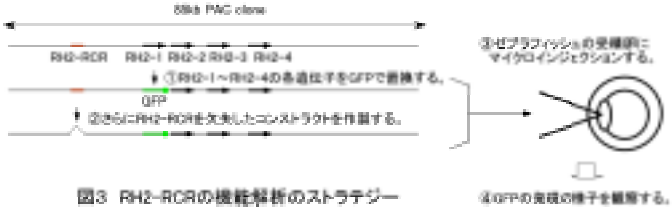

図3 RH2-RCRの機能解析のストラテジー

であるのかは不明であった。そこで、本研究では RH2 遺伝子群を含む 85kb の PAC クローンを用いて RH2-RCR の機能解析をすることにした（図３）。PAC クローンの各オプシン遺伝子の位置に GFP 遺伝子を挿入すれば、その GFP 遺伝子は内在のオプシン遺伝子と同様の転写制御を受けるものと期待される。そして、さらに RH2-RCR を欠失させたときの GFP 遺伝子の発現の変化を観察することで、RH2-RCR の機能を評価できると考えた。PAC クローンの改変は、大腸菌株 DY380 と EL250 を用いた相同組み換え法により行った。

LWS について

LWS 遺伝子についても RH2 のときと同様に PAC クローンにレポーター遺伝子を挿入し、それらが内在の LWS 遺伝子の発現パターンを再現できるかどうかを調べることにした。

[結果と考察]

RH2 PAC クローン組み換えコンストラクトの作製とその発現誘導能の解析

RH2 PAC クローン DNA において RH2-1~4 の各オプシン遺伝子の位置に GFP 遺伝子を挿入した。それら組み換え PAC DNA をゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションし、その幼魚眼球を解析したところ、RH2-1~4 のすべてについて、short members of double cone (SDC)特異的な GFP の発現を確認できた。また、RH2-1 についてはその組み換え PAC DNA を保持するトランスジェニックラインを樹立できたので、その F1 個体を解析した。GFP が SDC で特異的に発現していること、そして網膜周縁部では発現が消失するという内在 RH2-1 遺伝子の発現パターンを再現していることを確認できた。これらの結果より、本研究で用いた RH2 PAC クローンには十分な転写制御領域があり、挿入された GFP 遺伝子はその発現を再現できるものと考えられた。

RH2-RCR 欠失 PAC DNA コンストラクトの作製とその発現誘導能の解析

上の RH2 PAC DNA 組み換えコンストラクトで、さらに RH2-RCR を欠失させたコンストラクトを作製した。それらを上と同様に解析したところ、RH2-1~4 のすべてについて SDC における GFP の発現は観察されなかった。この結果から、RH2-RCR が RH2-1~RH2-4 のすべての発現に必要な領域であることが明らかとなり、それらの遺伝子に対して LCR (Locus Control Region)として機能していることが示唆された。

RH2-RCR を RH1 直上 1.1kb につなげたキメラコンストラクトの発現誘導能の解析

桿体オプシン RH1 の直上 1.1kb のプロモーターは桿体視細胞特異的な転写を誘導することが知られている。上と同様に GFP をレポーターとして、RH2-RCR を上流に付加した RH1 直上 1.1kb キメラプロモーターの発現誘導能を調べた。GFP が発現している細胞 70 個を解析したところ、そのうち 5 個は SDC であった。これより、RH2-RCR には SDC 特異性を誘導するための因子が含まれることが示唆された。

LWS PAC クローン改変コンストラクトの作製とその発現誘導能の解析

LWS-1 を GFP 遺伝子で置換し、LWS-2 を DsRed 遺伝子で置換した PAC DNA コンストラクトを作製した。これをゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションし、その幼魚眼球を観察したところ、GFP と DsRed はほとんどすべて同一の細胞でシグナルが観察された。それらの細胞はその形態と位置から視細胞であると推測された。これが、LWS 遺伝子の発現する long members of double cone (LDC)であるかはまだ明らかにできていないが、仮にそうであるとすると、上の結果はひとつの LDC 細胞が LWS-1 と LWS-2 の転写を同時に誘導できることを示唆している。そのもとで図２に示す LWS-1 と LWS-2 の領域的な使い分けを制御している仕組みが存在するとしたら興味深い。