

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
物質遺伝子の転写調節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

平成 16 年度 修士学位論文

東京大学大学院新領域創成科学研究科
先端生命科学専攻 人類進化システム分野

36533 辻村太郎

指導教官 河村正二

平成 17 年 1 月 31 日提出

目次

1 . 序論	3
2 . 試料と方法	1 0
3 . 結果	2 2
4 . 考察	3 2
5 . 謝辞	4 0
6 . 引用文献	4 1
7 . 図表	4 6
8 . 付記	7 0

1. 序論

色覚とは異なる波長の光を異なる色として認識することである。明暗だけでは区別できないものでも、色の識別により見分けられる場合がある。生物は食物を採集する時や、生殖行動における配偶者選択において色覚情報を重要な判断材料として用いており、色覚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。

視覚は視細胞に存在する視物質が光を受容することに起因し、それに続く神経伝達により達成されている。視物質は 7 回膜貫通型タンパク質であるオプシンと発色団であるレチナールにより構成され、オプシンのアミノ酸配列の違いにより視物質の光吸収特性は異なる。オプシンには、暗所で明暗の識別を担う桿体オプシン RH1 と明所で色識別を担う錐体オプシンとがある。錐体オプシンは、進化系統学的に SWS1 (紫外線型)、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(Yokoyama, 2000)。色覚が成立するためにはそれら 4 種類のうち 2 種類以上の錐体オプシンを持つことが必要であるが、それだけでは十分でない。錐体視細胞の興奮が神経系に伝達されるのであり、色覚の成立には異なる波長感受性を示す複数種類の錐体視細胞の存在が不可欠だからだ。そしてそれは大抵の場合 1 つの錐体視細胞に 1 種類のオプシンのみが特異的に発現されることで達成されている。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。

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、網膜には形態の異なる 4 種類の錐体視細胞がモザイク状に規則正しく並び、それぞれが 1 種類のオプシンのみを特異的に発現させている。Fig. 1 はそれを模式的に示したものである。ゼブラフィッシュの錐体視細胞には long single cone (LSC)、short single cone (SSC)、long members of double cone (LDC)、short members of double cone (SDC)がある(Branchek and Bremiller, 1984)。そして、LSC は SWS2(青型)

SSC は SWS1 (紫外線型)、LDC は M/LWS (赤型)、SDC は RH2 (緑型) を特異的に産生する(Raymond et al., 1993; Vihtelic et al., 1999)。魚類の色覚系にはさらに興味深い機構が存在する。魚類の各オプシン遺伝子グループが重複により生じたサブタイプを有することである。当研究室によりゼブラフィッシュオプシン遺伝子の全レパートリーが明らかにされており、RH2 (緑型)には RH2-1 ~ 4 の 4 種類のサブタイプが、LWS(赤型)には LWS-1 及び LWS-2 の 2 種類のサブタイプが存在することが明らかにされている(Fig. 2)(Chinen et al., 2003)。当研究室は *in vitro* 系での視物質再構成によりそれらの光吸収特性がサブタイプ間で異なることを示した。視物質の光吸収特性の代表値である λ_{max} は、RH2-1 が 467nm、RH2-2 が 476nm、RH2-3 が 488nm、RH2-4 が 505nm、LWS-1 が 558nm、LWS-2 が 548nm であった(Chinen et al., 2003)。また *in situ hybridization* 法によりそれらの発現領域がサブタイプ間で時間的・空間的に明確に異なることも明らかにしている(武智正樹 平成 15 年度修士学位論文)。Fig. 3 に示すように、RH2 遺伝子群についてみると、RH2-1 と RH2-2 は網膜の中央から背側にかけて発現し、RH2-3 と RH2-4 は網膜周縁部、特に腹側の領域で発現している。また、RH2-2 や RH2-3 では成長時期により発現場所が異なっている。LWS についてみてみると、LWS-2 は網膜の中央から背側にかけて発現し、LWS-1 は網膜の周縁部、特に腹側で主に発現している。RH2 においても LWS においても λ_{max} を長波長側に持つサブタイプが腹側の領域に発現しており、短波長側のものが中央から背側にかけて発現するという興味深い傾向がある。成長時期や空間的位置により光環境や目で捉えるべき対象は異なる。RH2 と LWS に見られるこのような機能分化はそれに適応してきたものと考えられ、魚類の生態と強く結びつきながら進化してきたものと考えられる。特にそれらの発現制御機構は、この機能分化の過程で重要な役割を果たしており、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。この研究には 2 つの意義がある。一つは、生物の色覚形成に必須な 1 視細胞 1 視物質の発現制御機構の解明につながること

で、もう一つはオプシン遺伝子サブタイプの機能分化という魚類独特の色覚進化の過程に考察を与えることである。

ここで、錐体オプシン遺伝子の発現制御に関するこれまでの知見を述べる。これまで、桿体オプシンの発現制御機構についてはよく調べられてきたが、錐体オプシンについての研究はまだあまり進んでいない。桿体オプシン RH1 については哺乳類のプロモーター領域において、Ret1 (PCE-1)、BAT1 (OTX)、NRE、Ret4 のシス因子が同定されており(Yu and Barnstable, 1994; Chen and Zack, 1996; DesJardin and Hauswirth, 1996; Rehemtulla et al., 1996)、またトランス因子として CRX (Chen et al., 1997; Furukawa et al., 1997)、NRL (Swaroop et al., 1992; Kumar et al., 1996; Rehemtulla et al., 1996)、QRX (Wang et al., 2004)、NR2E3 (Cheng et al., 2004)が同定されている。特に NRL は桿体細胞で特異的に発現する転写因子であり桿体オプシン RH1 のプロモーターに存在する NRE を特異的に認識する。これが視細胞で発現する転写因子 CRX と協調的に桿体オプシン遺伝子の転写を誘導していると考えられている(Mitton et al., 2000)。また、ゼブラフィッシュやアフリカツメガエルにおいて桿体オプシンの上流配列をつないだレポーター遺伝子を導入しそれが桿体細胞で特異的に発現することも確認された(Kennedy et al., 2001; Mani et al., 2001; Hamaoka et al., 2002)。NRL はアフリカツメガエルにおいても同定され、NRE は多くの生物種で保存されていることから、桿体オプシン遺伝子の制御機構は非常に保存的であると考えられる(Whitaker and Knox, 2004)。

錐体オプシンについては、いくつかの遺伝子についてトランスジェネシスの手法によりその転写制御 DNA 領域の研究が行われている。これまでにヒトの SWS1 (Chen et al., 1994)、M/LWS 遺伝子(Wang et al., 1999)、ゼブラフィッシュの SWS1 遺伝子(Takechi et al., 2003; Luo et al., 2004)、アフリカツメガエルの LWS 遺伝子(Moritz et al., 2002)でその上流配列が各々の錐体視細胞で特異的な発現を誘導できることが明らかになっている。特に、ゼブラフィッシュの SWS1 についてはよく解析されており上流 4.5kb 程度に位置する領域

と上流 450bp から 100bp 程度の領域とが必要であることが示されている(Luo et al., 2004)。また、ヒトの M/LWS 遺伝子が locus control region (LCR)によりコントロールされていることも示されている(Nathans et al., 1989; Wang et al., 1992; Wang et al., 1999; Smallwood et al., 2002)。LCR とは、ゲノム DNA 上でひとつの領域にクラスターとして存在している遺伝子群に対して、その全体の発現を調節する転写調節領域のことである。各遺伝子の直上プロモーターとの相互作用により転写を誘導し、各遺伝子の発現場所や時間を規定する役割を持つ。ヒトの X 染色体上には重複により生じた 2 つ(またはそれ以上)の M/LWS オプシン遺伝子がタンデムに並んで存在している。これらは最上流の遺伝子が赤感受性、2 番目以降の遺伝子が緑感受性として機能分化していて、お互い排他的に異なる錐体視細胞に発現している。5'側の遺伝子(赤オプシン)の転写開始点から 3.1kb-3.7kb 上流の領域が LCR として働き、赤オプシンまたは緑オプシン遺伝子それぞれの直上に存在するプロモーター領域と相互作用することによりどちらかひとつの遺伝子の転写が誘導されている。LCR による赤オプシンか緑オプシンかの選択は確率的に決定されていると考えられている。男性はひとつの X 染色体しか持たず、女性では片方の X 染色体が不活性化するので、一つの視細胞からは一種類のオプシンのみが特異的に発現するという仕組みになっている。これら以外の遺伝子については上流配列のうちの重要な領域を絞り込むような研究は行われていない。また、転写調節タンパク質としても、視細胞で特異的に発現している CRX の関与が示唆されているだけである(Furukawa et al., 1999; Livesey et al., 2000)。RH2 および SWS2 遺伝子についてはこれまでその発現制御機構に関わる報告はなかった。

ゼブラフィッシュの RH2 遺伝子の発現制御機構については、当研究室が最近行った研究により、いくつかの知見が得られた(知念秋人 博士学位論文)。まず、RH2-1~RH2-4 の各遺伝子の直上配列に GFP (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子をつないだ DNA コンストラクトを作製し、これら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た実験により、各遺伝子の上流域の転写誘導能が調べられた(Fig. 4)。RH2-1 の上流 7.3kb、上流 1.5kb で

は GFP の発現を誘導できなかった。RH2-2 の上流 3.0kb で眼球における GFP の発現を誘導できたが、この DNA コンストラクトが挿入されたトランスジェニックラインを樹立して解析したところ、それは視細胞ではなく双極細胞で発現していた。RH2-3 の上流 2.6kb では眼球で GFP が発現しており、RH2-2 と同じようにライン化して解析したところ、short members of double cone (SDC)で発現していた。しかし、それは網膜の中心付近で発現し、RH2-3 は網膜の周縁部で発現するとする in situ hybridization の結果(Fig. 3a)とは異なっていた。RH2-4 の上流 6.7kb、上流 1.3kb では GFP の発現を誘導できなかった。

次に、RH2-1 の上流 1.5kb に GFP 遺伝子をつなげた DNA コンストラクトと、すべての RH2 遺伝子を含む長インサート PAC クローンの制限酵素断片との co-injection が行われた (Fig. 5)。その結果 RH2-1 の上流 15kb に位置する EcoR I /Sac I の制限酵素断片(0.5kb)だけが RH2-1 の GFP の発現を誘導することが示された。そこで、この 0.5kb の領域は RH2 の Remote Control Region (RH2-RCR)と命名された。この結果を踏まえて、RH2-1 から RH2-4 それぞれの直上域にこの RH2-RCR を付加し、それにつなげられた GFP 遺伝子の発現がゼブラフィッシュへのトランスジェネシスにより調べられた(Fig. 6)。RH2-1 の上流 1.5kb に RH2-RCR を付加したものでは眼球で GFP が発現した。さらにトランスジェニックラインの解析によりこれが short members of double cone (SDC)で発現していることが確認された。網膜における発現領域も、中心付近のみで強く発現し、RH2-1 の in situ hybridization の結果(Fig. 3a)と一致していた。RH2-2 の上流 3.0kb に RH2-RCR を付加したものでも GFP が眼球で発現した。トランスジェニックラインを解析し、これもまた SDC で発現していることが確認された。網膜における発現領域は中心から背側にかけての範囲であり、これもまた RH2-2 の in situ hybridization の結果(Fig. 3a)と一致していた。ただし、一部のトランスジェニックラインでは、少数の双極細胞や桿体細胞でも GFP が発現していた。RH2-3 の直上 2.6kb に RH2-RCR をつないだものでは GFP の発現を誘導し、トランスジェニックラインの解析により SDC における発現であることが確認された。ただし、

その発現領域はやはり網膜の中心付近であり (in situ hybridization の結果では RH2-3 の発現領域は網膜の腹側周縁部; Fig.3a) RH2-3 の直上域のみによる GFP の発現パターンと比べて変化はなかった。RH2-4 の直上 1.3kb に RH2-RCR を付加したものでは GFP の発現を誘導できなかった。これもまた RH2-4 の直上域のみのときと変化のない結果となった。以上の結果は Table 1 にまとめた。

これらの実験結果により RH2-1 の上流 15kb に位置する RH2-RCR が RH2-1 及び RH2-2 の転写誘導に関わっていることが示された。そして、この RH2-RCR が RH2 遺伝子群の発現に対して LCR として機能することも示唆する結果であった。しかし疑問がいくつか残る。まず、これまでの実験では RH2-RCR の RH2-3 および RH2-4 に対する影響は不明であった。また、RH2-1 と RH2-2 についても他に RH2-RCR の役割を補える領域があって、実際に生体内でそのような領域によって RH2-1 および RH2-2 の転写を誘導しているという可能性を否定できていない。特に、RH2-2 については RH2-2 直上域との co-injection の実験を行っておらず、RH2-RCR 以外の他の領域の影響を評価していない。また、RH2-RCR の機能とは別に、不明な点もいくつかある。まず、RH2-2 の直上域が誘導する双極細胞や桿体細胞における発現を抑制するメカニズムが明らかでない。RH2-3 の転写制御機構については、網膜の周縁部のみで発現を誘導するメカニズムが存在するはずであるが、それはまったく不明である。そして、RH2-4 については SDC への発現を誘導するための領域がまったくわかっていない。

ゼブラフィッシュの LWS 遺伝子については、これまでに当研究室で行われた予備的な実験結果、および Luo らの報告(Luo et al., 2004) (これは LWS-1 についてのみの言及) で直上域のみでは転写誘導を行えないことが分かっていた。

これらの研究状況を踏まえて、私はゼブラフィッシュ RH2 および LWS の発現制御機構の研究を進めるに当たって以下の目的を定めた。

RH2

RH2-RCR の役割を解析することにした。具体的には、RH2 遺伝子を含む 85kb の PAC クローンから RH2-RCR を欠失させたコンストラクトを作製し、欠失していない PAC DNA と比べて各 RH2 遺伝子の発現誘導能にどのような変化が現れるかを解析することにした。そのために各 RH2 遺伝子の位置に GFP 遺伝子を挿入し、その PAC DNA コンストラクト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た後 GFP の蛍光を観察し、各 RH2 遺伝子の発現状況をトレースすることにした。まず、RH2-RCR が存在する場合に GFP が内在の各 RH2 遺伝子の発現状況を正しく再現していることを確認したいと考えた。これが確認できれば、この PAC クローンに RH2 遺伝子の発現を再現するための十分な制御領域があることと、GFP 遺伝子の発現がその制御を正しく受けていることが保証される。その上で RH2-RCR を欠失させたときの GFP の発現の様子を観察し変化が現れたら、その差が RH2-RCR の果たしている役割であると言える。このストラテジーにより、上述、の観点からこれまで明らかにできなかった RH2-RCR の機能をより明確にできる。そして、
～ の疑問に対しても、RH2-RCR の機能の理解を通してヒントが与えられるのではないかと期待した。

LWS

LWS についても RH2 と同様に大きなゲノム領域を含む PAC クローンをを用いて発現制御機構を解析することにした。本研究では LWS の PAC クローンを得て LWS-1 の位置に GFP 遺伝子を、LWS-2 の位置に DsRed 遺伝子を挿入し、それらの発現が *in situ hybridization* と同じパターンを示すかどうかを確かめることにした。

2. 試料と方法

(1) 試料

本研究に使用したゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)は、WIK および TL 系統である。これらのゼブラフィッシュは水温 28 °C、6 × 10⁻³%濃度の人工海水用塩(instant ocean: Aquarium Systems)中で飼育し、蛍光灯の点灯：消灯を 14 時間：10 時間で切り替えた。餌は、成魚に対しては固形の乾燥試料(テトラミン：テトラベルケ社)及びブラインシュリンプを、幼生に対しては粉末飼料(初期試料協和 A 粒度 250: 協和発酵)を与えた。眼球の観察を容易にするために観察の対象とした幼生はすべて受精後 12 から 24 時間後にメラニン形成阻害剤である 1-phenyl-2-thiourea (PTU)を 3 × 10⁻³%になるように飼育水に添加した。その他、飼育に関しては(Westerfield, 1995)を参考にした。

(2) 方法

PAC クローンのスクリーニングと制限酵素地図の作成

ゼブラフィッシュの RH2 遺伝子あるいは LWS 遺伝子を含む PAC クローンは、Resource Center Primary Database (RZPD, Germany; <https://www.rzpd.de/>) にゼブラフィッシュの PAC ライブラリー (no. 706, originally created by C. Amemiya)のスクリーニングを委託して得た。このうち RH2 の PAC クローンについてはすでに当研究室において制限酵素地図が作成されていた(Fig. 5a)(知念秋人 博士学位論文)。LWS の PAC クローンはプローブとして LWS-2 遺伝子の全長 cDNA を用いることで単離された。これにより SWS2 遺伝子と 2 つの LWS 遺伝子 LWS-1、LWS-2 をすべて含む DNA クローン BUSMP706H1397Q9 及び BUSMP706E19271Q9 を得た(以下それぞれ LWS PAC H、LWS PAC E と約す; Fig. 7)。

LWS PAC クローンのインサートサイズは PAC DNA を NotI で制限酵素消化した後、パルスフィールド電気泳動を行い調べた。その結果 LWS PAC H は 110kb、LWS PAC E は

80kbであった。また、インサートの両端の配列を読み、Ensembl Zebrafish Genome Server (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/)で blast 検索を行い、PAC クローンの塩基配列と一致すると考えられる配列情報を得た。この配列情報に基づいて BamH I、Kpn I、Not I の制限酵素地図を作成した(Fig. 7)。

PAC クローンの改変

i)PAC クローン組み換え用ターゲティング DNA 断片の作製

PAC クローンを相同組み換えによって改変するために、抗生物質耐性遺伝子を含み、両端に 45bp 程度のターゲティング配列を持つ DNA 断片を作製した。まず、以下に示す 5 つのプラスミドを作製し、それらをテンプレートとして 5'側に相同組み換えにおけるターゲティング配列を付加したプライマーを用いて PCR 増幅をして、以下の各種ターゲティング DNA 断片を作製した(Fig. 8)。

pEGFP-CAT と GFP-CAT ターゲティング DNA 断片

pEGFP-CATはGFP-poly Aの直下にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)遺伝子をつなげたカセットをもつプラスミドである。まず、pEGFP-1 (Clontech)の Not I サイトをフィルインライゲーションにより消去した。具体的には Not I で制限酵素処理した後、Klenow 酵素で 37 °C、60min 処理し、セルフライゲーションした。次に、pEGFP-1(Not I-)の Afl II サイトに CAT 遺伝子を導入した(Fig. 8a)。CAT 遺伝子は国立遺伝学研究所より分与していただいた pBR328 から以下のプライマーを用いて PCR 増幅し、Afl II で制限酵素処理した後、pEGFP-I ベクターとライゲーションした。この pEGFP-CAT プラスミドがクロラムフェニコール耐性を示すことは確認した。

CAT 遺伝子増幅用プライマー。各プライマーの 5'側には Afl II 認識サイトを付加してある。

CAT-AflII-FOR 5' AATGCTTAAGCGAATAAATACCTGTGACGG 3'

CAT-AflII-REV 5' GTTTCCTTAAGAACTGGCCTCAGGCATTTG 3'

次に、RH2-1~RH2-4、および LWS-1 の各遺伝子のエキソン 1 を相同組み換えにより

GFP-CAT のカセットに置換するためのターゲティング DNA 断片を作製した。pEGFP-1 を BamH I で直鎖状にしたものをテンプレートとして、それぞれ以下のプライマーを用いて PCR を行い作製した。

RH2-1~RH2-4 および LWS-1 の組み換えに用いた GFP-CAT DNA 断片増幅用プライマー。RH2-1<>GFP-CAT-FOR は RH2-1 のエキソン 1 を GFP-CAT に置換するための DNA 断片増幅用プライマー、forward 側という意味である。-REV は reverse 側。以下同様。網掛けは PAC DNA と相同なターゲティング配列としてプライマーに付加した部分)

RH2-1<>GFP-CAT-FOR 5' ATTCATATTTCCACATAGGCGGTTTTAATTTAGGTTTC
AGTAAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGG 3'

RH2-1<>GFP-CAT-REV 5' CATGTA CTGCATTCAAATCTATGCACTGCTAGTTACTC
CTTACCTAACTGGCCTCAGGCATTTG 3'

RH2-2<>GFP-CAT-FOR 5' GTTTTGCTGGTGTCTTCTTGGCATACTGCAACACCT
CCAGCAGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG 3'

RH2-2<>GFP-CAT-REV 5' TGAAACAATAAAAATAAACGAATTCCTGCTGAAATATT
CTTACCTAACTGGCCTCAGGCATTTGAG 3'

RH2-3<>GFP-CAT-FOR 5' AACAGATTGCATCCTCCTCGTGTTCTGGATCACTAGC
AGGCAGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG 3'

RH2-3<>GFP-CAT-REV 5' TCAAATAAATCCAAAAGGTAAACTGCAGAACAATTAT
CCTCACCTAACTGGCCTCAGGCATTTGAG 3'

RH2-4<>GFP-CAT-FOR 5' AGCAGGTTACATCTTTTCATCCATCTGGATCTTTAGC
AGGTAGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG 3'

RH2-4<>GFP-CAT-REV 5' ATCTACTAGCGGTGTATATTGTCAACTAGGCTAAATAA
GA(G/T)CTCACCTAACTGGCCTCAGGCATTTGAG 3'

LWS-1<>GFP-CAT-FOR 5' CAGCTAAGTGACTACAGGTTTGGGCTATACAACAAAC

CCCAAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG 3'

LWS-1<>GFP-CAT-REV 5' ATCAAATTACAAATATTTGTGTGAAAAAAGTTGAAAG

ACTCACCCAACTGGCCTCAGGCATTTGAG 3'

pDsRed-tet^r

pDsRed-tet^r は DsRed-polyA の直下にテトラサイクリン耐性遺伝子(tet^r)をつなげたカセットをもつプラスミドである。まず、pDsRed1-1 (Clontech)の Afl II サイトにテトラサイクリン耐性遺伝子を挿入した。テトラサイクリン耐性遺伝子は、pBR328 をテンプレートとして以下のプライマーを用いて PCR 増幅した。次に、このプラスミドの Not I サイトをフィルインライゲーションにより消失した(Fig. 8b)。

テトラサイクリン耐性遺伝子増幅用プライマー。各プライマーの 5'側には AflII 認識サイトを付加してある。

tet^r-AflII-FOR 5' ATTCCTTAAGTTCTCATGTTTGACAGCTTA 3'

tet^r-AflII-REV 5' GGAACCTTAAGTGGATATGTTCTGCCAAGG 3'

pBS-DsRed-Km^r と DsRed-Km^r ターゲッティング DNA 断片

pBS-DsRed-Km^r は DsRed-polyA の直下にカナマイシン耐性遺伝子(Km^r)をつなげたカセットをもつプラスミドである。上記 pDsRed-tet^r より、EcoR I/Hind III の制限酵素処理で DsRed 遺伝子を含むインサート DNA を得て、これを pBlueScriptII(SK-) (Stratagene) の EcoR I/Hind III サイトに挿入して、pBS-DsRed とした。カナマイシン耐性遺伝子は、RH2 の PAC クローンのベクター(pCYPAC6、カナマイシン耐性遺伝子が挿入されている) をテンプレートとして、以下のプライマーを用いて PCR 増幅した。これを Afl II で処理して、pBS-DsRed の Afl II サイトに挿入した(Fig. 8c)。

カナマイシン耐性遺伝子増幅用プライマー。各プライマーの 5'側には Afl II 認識サイトを付加してある。

Km^r-AflII-FOR 5' CATTCTTAAGTCTCAAAATCTCTGATGTTA 3'

Km^r-AflIII-REV 5' CTACCTTAAGCCTGAATCGCCCCATCATC 3'

この pBS-DsRed-Km^r を Sal I により直鎖状にした DNA をテンプレートとして、以下のプライマーを用いて PCR を行った。これにより LWS-2 のエキソン 1 を相同組み換えにより DsRed-Km^r のカセットに置換するためのターゲティング DNA 断片を作製した。

LWS-2 を置換するターゲティング DNA 断片増幅用プライマー。網掛けはターゲティング配列。

LWS-2<>DsRed-km^r-FOR 5' AATGGAAATAATTCTTTTATTTATTTGATCTTCAGGG
TTTCCAAAATGGTGCCTCCTCCAAGAAC 3'

LWS-2<>DsRed-km^r-REV 5' ACATGATTTATCCAGCTGTTCCCTGAAGATTAAGTTA
GTATTTTACCCTGAATCGCCCCATCATCC 3'

pBS-FRT-CAT と FRT-CAT ターゲティング DNA 断片

pBS-FRT-CAT は CAT 遺伝子の両端に FRT 配列が付加されたカセット(FRT-CAT)を持つプラスミドである。FRT 配列(GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC)とは 34bp からなる、flpe リコンビナーゼにより特異的に認識される配列である。同じ向きに 2 つの FRT 配列が並ぶ DNA に対して flpe を作用させると、FRT 配列の間が切り出され、ひとつの FRT 配列のみが残る。まず、CAT 遺伝子の両端に FRT 配列を付加した断片を、pBR328 をテンプレートとして、以下のプライマーを用いて PCR 増幅した。Klenow 酵素で平滑末端化、T4 Kinase で 5'末端リン酸化をした後、これを pBluescript II(SK-)の EcoRV サイトに挿入した(Fig. 8d)。

FRT-CAT カセット増幅用プライマー。網掛けは FRT 配列。

FRT-CAT-FOR 5' GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCGAATAAA
TACCTGTGACGGAAG 3'

FRT-CAT-REV 5' GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCAACTGGCC
TCAGGCATTTGAGAAG 3'

pBS-FRT-CAT を BamH I により直鎖状にした DNA をテンプレートとして、以下のプライマーを用いて PCR を行った。これにより、RH2-RCR を FRT-CAT で置換するための DNA 断片および、RH2-RCR を 2 つに分けたときのそれぞれを FRT-CAT で置換するための DNA 断片を作製した。

RH2-RCR を置換する FRT-CAT ターゲティング DNA 断片増幅用プライマー。網掛けはターゲティング配列。

RH2-RCR<>FRT-CAT-FOR 5' TCTTAGAATGTAATAAAAAACAACCTTCATTATATAG
TATTATCTGTTTATGAAGTTCCTATTCTCTAGA 3'

RH2-RCR<>FRT-CAT-REV 5' CAATAAATAACCATTTATTTGGACTATTATAAAAAA
AATCATGCACTTTACGATGAAGTTCCTATACTTTC 3'

さらに、RH2-RCR<>FRT-CAT-FOR と以下の RH2-RCR(1-241)<>FRT-CAT-REV を用いて RH2-RCR の 5'側 241bp を FRT-CAT カセットに置換するための DNA 断片を PCR 増幅し、RH2-RCR(243-511)<>FRT-CAT-FOR と RH2-RCR<>FRT-CAT-REV とを用いて RH2-RCR の 3'側 269bp を FRT-CAT カセットに置換するための DNA 断片を PCR 増幅した。

RH2-RCR(半分)を置換する FRT-CAT ターゲティング DNA 断片増幅用プライマー。網掛けはターゲティング配列。

RH2-RCR(1-241)<>FRT-CAT-REV 5' GTGTGTCAACCCCTTCAAGGAGGATTTCCA
GCCACAAGTAGCTTGCGATGAAGTTCCTATACTTTC 3'

RH2-RCR(243-511)<>FRT-CAT-FOR 5' AATAGTGTTAACAGCTTGTCAGGGCCTTT
TTGCGCCTGTAATGGGATGAAGTTCCTATTCTCTAGA 3'

pBS-I-Sce I-Amp^r

pBS-I-Sce I-Amp^r はアンピシリン耐性遺伝子(Amp^r)の両端に I-Sce I エンドヌクレアーゼ認識サイトを付加したカセット(I-Sce I-Amp^r)を持つプラスミドである。I-Sce I は

TAGGGATAACAGGGTAAT の 18 塩基を特異的に認識し切断するエンドヌクレアーゼである。アンピシリン耐性遺伝子の両端に I-Sce I 認識サイトを付加した DNA 断片を、pUC18 をテンプレートに以下のプライマーを用いて PCR 増幅した。これを pBluescript II(SK-) の EcoR V サイトに挿入した。インサートの塩基配列はシーケンシングにより確認した (Fig. 8e)。

I-Sce I-Amp^r カセット増幅用プライマー。網掛けは I-Sce I 認識配列。

I-Sce I-Amp^r-FOR 5' TAGGGATAACAGGGTAATGGTCTGACGCTCAGTGGAAC 3'

I-Sce I-Amp^r-REV 5' ATTACCCTGTTATCCCTAAGACGAAAGGGCCTCGTGATAC 3'

次に、pBS-I-Sce I-Amp^r を BamH I、Xho I で制限酵素処理した DNA をテンプレートとして以下のプライマーを用いて PCR を行った。これにより、PAC クローンベクター (pCYPAC6) のカナマイシン耐性遺伝子を I-Sce I-Amp^r のカセットで置換するための DNA 断片を作製した。

PAC ベクターのカナマイシン耐性遺伝子を置換する I-Sce I-Amp^r ターゲッティング DNA 増幅用プライマー。網掛けはターゲッティング配列。

PAC Km^r-I-Sce I-Amp^r-FOR 5' GCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTG
CTGACTCATACCAGCAGGAATTCGATTAGGGATAAC 3'

PAC Km^r-I-Sce I-Amp^r-REV 5' AAAGCCACGTTGTGTCTCAAATCTCTGATGTT
ACATTGCACAAGTCGATAAGCTTGATATTACCCTG 3'

なお、これら PCR により得られた DNA フラグメントは、アガロースゲルで泳動後切り出して Ultra Clean 15 (Mo Bio) を用いて、10~100ng/ul の濃度に精製した。

ii) PAC クローンの改変

RH2 および LWS 遺伝子の PAC クローンに対し、PAC クローン中の遺伝子第 1 エキソンあるいは制御領域と で作製した遺伝子カセットを置換するための相同組換えと、flpe の誘導による PAC クローン中の FRT 配列に挟まれた DNA 領域の切り出しをおこなった (Fig. 9)。

相同組み換えは、National Cancer Institute-Frederick の N. Copeland にいただいた大腸菌株 DY380 または EL250 を用いて行った。大腸菌株 DY380 および EL250 は ファージの gam および beta、exo 遺伝子を溶原化プロファージとして保持し、温度感受性 リプレッサー-cI857 によりそれらの発現をコントロールできる(Yu et al., 2000; Copeland et al., 2001; Lee et al., 2001)。この系においては 42 °C のヒートインダクションで gam、beta、exo が発現する。gam が大腸菌の recBCD を不活性化し、外来の直鎖状 DNA を安定に維持できる。そして、beta および exo により 40~50bp という短い相同配列により高い効率で相同組み換えを起こすことができる。温度感受性でコントロールできるため、recBCD の不活性化による大腸菌の生育への悪影響は一時的なものになり、また、exo や beta の発現も一時的なものとなるので大腸菌内の DNA は安定に保持される。これらの遺伝子は、大腸菌ゲノムにプロファージとして溶原化されているため、ひとつの細胞当たり 1 コピーのみで存在しており、厳密な温度感受性制御が達成される。また、EL250 ではアラビノースにより flpe の発現を誘導できる。flpe は FRT 配列を特異的に認識するリコンビナーゼである。相同組み換えにおいては、すべて抗生物質耐性遺伝子を持つ DNA 断片を用いて行い、組み換え体のセレクションは対応する抗生物質を含む選択培地上で行った。

相同組み換えの手順

変更したい PAC クローンを DY380 または EL250 にエレクトロポレーション法により導入した。エレクトロポレーションは、ELECTRO CELL MANIPULATOR 600 (BTX Inc.) で、抵抗 129 Ω、電圧 2.45kV、キュベット幅 2mm で行った。つづいてそれらの菌を 32 °C で終夜培養し、それを 50ml の LB 培地に 1%の濃度で植え継いだ。32 °C で 2.5 時間程度培養し 600nm の吸光度が 0.5 程度になったところで、50ml の培養液を 25ml ずつ 2 つに分けた。一方は 42 °C で 15 分間培養し gam、beta、exo のヒートインダクションを行い、その後氷水中で冷却した。もう一方は、ネガティブコントロールとして 32 °C で 15 分間培養した後氷水中で冷却した。これら的大腸菌は、まず 3700rpm、4 °C、10 分間遠心して沈殿させ、

上精を除去した後、30ml の氷冷した滅菌水で洗い、同様に遠心して上精を除き、さらに 1ml の冷滅菌水で洗い遠心して上精を除き、200 μ l の滅菌水に懸濁した。この大腸菌懸濁液の 50 μ l に対して、相同組み換えにより挿入したい で作製した DNA 断片の溶液(10~100ng/ μ l)3 μ l を混ぜ、上述の条件でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション後、直ちに LB 培地 1ml を加え、32 で 1 時間から 2 時間振とうした。これを対応する抗生物質を含む LB プレートにまき、32 で終夜培養した。抗生物質は以下の濃度で用いた。

クロラムフェニコール 10mg/l

カナマイシン 10~20mg/l

アンピシリン 20mg/l

生育したコロニーは LB 培地に植え継ぎ、終夜培養した後、50%グリセロールを終濃度 20%で加えてグリセロールストックとした。

flpe の誘導

FRT-CAT カセットを相同組換えで PAC 中に組み込んだ EL250 は 32 で終夜培養し、それを 2ml の LB 培地に 10%の濃度で植え継いだ。32 で 1.5 時間程度培養し 600nm の吸光度が 0.5 程度になったところで、10%の濃度で超純水に溶かした L(+) arabinose (Sigma)を 20 μ l 加えて flpe の誘導を行った。さらに 32 で 1 時間培養した後適当量を LB プレートにまいた。生育したコロニーは LB 培地に植え継ぎ、終夜培養した後、50%グリセロールを終濃度 20%で加えてグリセロールストックとした。

改変 PAC クローンの確認

以上で改変した PAC クローンはすべて Not I、BamH I、Kpn I で制限酵素消化した後アガロースゲル電気泳動でバンドパターンを確認した。PAC クローンのベクターに I-SceI-Amp^r のカセットを挿入した時は、アンピシリン耐性が得られたこと、カナマイシン耐性が失われたこと、I-Sce I により切断を受けることを確認した。RH2-RCR を FRT に置換した時はその部位の塩基配列を確認した。その他 GFP 遺伝子および DsRed 遺伝子を挿

入した時は、挿入カセットの境界の塩基配列および GFP と DsRed のコーディング塩基配列に変異がないことを確認した。

RH1 直上プロモーターと RH2-RCR のキメラコンストラクトの作製

Hamaoka らにより、桿体オプシン RH1 の直上 3.7kb の領域が pEGFP-1 の Sal I/BamH I サイトに挿入されたプラスミド RH1up3.7kb::GFP が作製されている(2002)。RH1up3.7kb::GFP を Bgl II で制限酵素処理した後、ベクター部分をセルフライゲーションして、RH1 の直上プロモーター配列 1.1kb に GFP 遺伝子をつなげたコンストラクト RH1up1.1kb::GFP を作製した。

次に、RH2-RCR を RH1 の直上 1.1kb プロモーター配列に付加し、その下流に GFP 遺伝子をつなげたコンストラクト RH2-RCR::RH1up1.1kb::GFP を作製した。まず、pEGFP-1 の EcoR III サイトに RH2-RCR が挿入され、その下流の Bgl II/Sal I サイトに RH2-1 の直上 1.5kb が挿入されたプラスミド RH2-RCR::RH2-1up1.5kb::GFP (知念秋人 平成 15 年度博士学位論文)を、Bgl II/Not I で制限酵素処理した。このベクターに、RH1up3.7kb::GFP を Bgl II/Not I で制限酵素処理して得られたインサートを挿入し、RH2-RCR::RH1up1.1kb::GFP とした(Fig. 17)。これら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するときは Alw44 I で制限酵素消化し直鎖状にした。

ゼブラフィッシュ受精卵への DNA の注入

レポーター遺伝子発現 DNA コンストラクトは、受精後 30 分程度の 1 細胞期の卵に対して実体顕微鏡で観察しながらガラス針で注入した。ガラス針はガラス管 G-1 (ナリシゲ) をブーラーを用いて針状に加工したものを使用した。PAC DNA は Plasmid Midi Kit (QIAGEN)により精製した。通常のプラスミド DNA は常法に従って精製した。I-Sce I 認識サイトを持つ PAC DNA は I-Sce I と co-injection した (PAC DNA 20ng/μl、0.5 × I-Sce I バッファー (New England)、I-Sce I (New England) 0.5u/μl、0.1% tetramethyl-rhodamine dextran (Molecular Probes))。それ以外の DNA コンストラクトについては適当な制限酵

素消化で直鎖状にした後、KCl と tetramethyl-rhodamine dextran をそれぞれ終濃度 0.1M と 0.1%になるように加えて DNA を 20~30ng/ μ l に合わせてマイクロインジェクションを行った。

トランスジェニックラインの樹立

各種発現コンストラクトを注入した受精卵を飼育し生殖可能となった成魚に対して、トランスジェニック個体のスクリーニングを以下の方法で行った。

まず、マイクロインジェクションを行った個体と野生型成魚を掛け合わせて受精卵を得た。生後 30 から 40 時間の受精卵 30 個程度を 500 μ l のゲノム抽出用 Lysis バッファー(組成; 付記参照)に浸し、ローテーターで振とうしながら 65 °C で 2 時間、55 °C で一晩置いた。これを 95 °C で 10 分間煮沸し、ゲノム DNA を得た。これを鋳型として GFP 遺伝子配列の一部を増幅するオリゴプライマー-GFP-FOR、GFP-REV を用いて PCR を行い、増幅の有無によってスクリーニングした。コントロールとして Wnt5a 遺伝子を検出するオリゴプライマーである Wnt5a-FOR と Wnt5a-REV を使用した(Meng et al., 1999)。

トランスジェニックラインスクリーニング用プライマー

GFP-FOR 5' TACGGCGTGCAGTGCTTCAG 3'

GFP-REV 5' TGTTGTAGTTGTACTCCAGC 3'

Wnt5a-FOR 5' ACTTCCGGCGTGTTGGAGAATTC 3'

Wnt5a-REV 5' CAGTTCTCACGTCTGCTACTTGCA 3'

幼生眼球に対する Whole-mount 抗体染色

受精後一週間の幼生を固定液(4% paraformaldehyde / 1 \times PBS)に室温で 1 時間浸した後、PBST (1% Tween-20/ 1 \times PBS)で 3 回洗浄した。実体顕微鏡下で注意深く眼球を取り出し、PBS(組成; 付記参照)に終濃度 20 μ g/ml になるように Proteinase K を添加した溶液に室温で 10 分間浸した。これを PBST で 1 回洗浄した後、固定液に室温で 30 分間浸した。PBST で 3 回洗浄した後、ブロッキング溶液(5% goat serum: Sigma/PBST)に移してローテータ

ーで穏やかに振とうしながら室温で1時間ブロッキングを行った。この眼球を、抗 RH2 オプシン抗体をブロッキング溶液に500倍希釈した溶液に浸して4日で一晩反応させた。反応後、PBSTで30分間6回洗浄した後、2次抗体(anti-rabbit IgG-Cy3 conjugated: Sigma)を抗体希釈液(1% goat serum /PBST)に400倍希釈で添加した溶液に眼球を浸し、室温で1時間反応させた。反応後、PBSTで30分間6回洗浄した。眼球を30、50、70%グリセロール溶液に順次入れ替えて、スライドガラスにのせて観察した。

顕微鏡観察

幼生眼球の蛍光観察には共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss)を使用した。それ以外の観察は顕微鏡 Axioplan 2 (Carl Zeiss)を使用し、CCDビデオカメラ AxioCam (Carl Zeiss)を使って画像を取得した。

3 . 結果

(1) RH2 PAC クローンの改変コンストラクトの作製

当研究室で、Fig. 5a に示す 85kb の PAC クローンを保有していた(知念秋人 博士学位論文)。その大きさからこの PAC クローンは RH2 遺伝子の転写制御領域を十分に含むものであると期待された。私は、RH2 各遺伝子の位置に GFP 遺伝子を挿入すればその発現はオプシン遺伝子の発現を忠実に再現できるものと考えた。そして、さらにある DNA 領域を欠失させたときの GFP 発現の変化を観察すれば、その領域のオプシン遺伝子の発現制御における役割を評価できると考えた。そこで、それらの改変 PAC クローンコンストラクトを作製することをまず試みた。PAC クローンのような大きな DNA を改変するには、通常のプラスミド DNA を改変するときのように制限酵素で切断・挿入することは難しい。そこで、相同組み換えにより PAC クローンを改変することにした。PAC クローンや BAC クローンの相同組み換えの方法にはいくつか報告があるが(Jessen et al., 1998; Jessen et al., 1999; Chiu et al., 2000)、その中で私は ファージの gam および beta、exo 遺伝子を溶原化プロファージとして保持し、温度感受性 リプレッサー cI857 によりそれらの発現をコントロールできる大腸菌株 DY380 および EL250 による方法を用いた(Yu et al., 2000; Copeland et al., 2001; Lee et al., 2001)。この系を用いて、私は RH2 PAC クローンにおいて各オプシン遺伝子の開始コドンから下のエキソン 1 をそれぞれ GFP 遺伝子に置換することにした。エキソン 1 だけを変えたのはイントロンにも転写制御領域が含まれる可能性があるからである(Lin et al., 2004)。GFP 遺伝子には poly A 付加シグナルと、その下流にクロラムフェニコール耐性遺伝子である CAT 遺伝子を接続して PAC DNA に挿入することにした(Fig. 9a)。pEGFP-CAT をテンプレートとして、挿入したい位置の配列 45bp 程度を付加したプライマーにより PCR 増幅したものをターゲット DNA フラグメントとし、これを 42 °C で培養してインダクションをかけた DY380 に導入した。クロラムフェニコール培地でセレクションして目的の相同組み換え PAC クローンを得た(Fig. 10a)。

次に私は、RH2 Remote Control Region (RH2-RCR)を欠失させることにした。これは RH2-RCR を FRT-CAT のカセットで置換した後 flpe の誘導により FRT 配列に挟まれた CAT 耐性遺伝子の間を切り出すことで行った。これにより、RH2-RCR が FRT 配列 34bp に置換された(Fig. 9b)。さらに、RH2-1~RH2-4 の各オプシン遺伝子のエキソン 1 を上と同様にして GFP-CAT で置換した(Fig. 10b)。これらはすべて大腸菌株 EL250 を用いて行った。

(2) RH2 PAC クローン改変コンストラクトのマイクロインジェクション

まず、RH2 PAC クローンの RH2-1~RH2-4 をそれぞれ GFP 遺伝子に置換した DNA コンストラクトを一細胞期の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、GFP の蛍光が眼球において見られるか観察した。5 days post fertilization (dpf)までに RH2-1~RH2-4 のすべてについて眼球で GFP の蛍光が観察された。また、個体によっては眼球以外でも GFP の蛍光が観察された。これは今回観察の対象としたものが、GFP 遺伝子がマイクロインジェクションにより導入された個体(トランジェントトランスジェニック個体)であり、GFP 遺伝子を発生の最初から保持しているのではないためである可能性が考えられた。それは、ゲノム DNA が細胞分化の過程でメチル化などの修飾を受けながら遺伝子の活性状態は規定されていくので、発生段階の途中で導入された遺伝子が本来の発現パターンを示さないことはありえるからである。ここで見られた GFP のエクトピク的な発現も同様の原因によると考えた。そこで、以下は眼球における GFP 蛍光のみを評価の対象とした。

RH2 オプシン遺伝子は網膜の錐体視細胞のうち short members of double cone (SDC)に発現することが知られている(Fig. 1)。ゼブラフィッシュの SDC のマーカーとして Vihtelic ら(Vihtelic et al., 1999)によって RH2-1 の C 末 80 アミノ酸残基を抗原としてウサギポリクローナル抗体が作製されている。そこで私はこの抗体を用いて、上で見られた GFP の蛍光が本来 RH2 オプシン遺伝子が発現する細胞である SDC において特異的に発現しているの

かを確かめることにした。具体的には各 PAC DNA コンストラクトをインジェクションし、眼球で GFP 蛍光を示した個体について、7dpf の時点で眼球を摘出し、上の抗体を用いて抗体染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、そのシグナルと GFP 蛍光とが重なるかどうかを調べた(Fig. 11-14)。

RH2-1 については、観察した GFP の蛍光はすべて short members of double cone (SDC) で発現していた。Fig. 11 はそれを示した図である。Fig. 11 の(a)~(c)は眼球の裏側から網膜の中央付近を平面的に捉えた写真である。(a)のマゼンタは抗 RH2 オプシン抗体のシグナルで、SDC 細胞を表す。(b)の緑色は、GFP のシグナルで、(c)は(a)と(b)の重ね合わせ画像である。視細胞は網膜の外側に向かって伸びており、網膜を平面で捉えると視細胞が並んで位置している(Fig. 1b)。Fig. 11a,c のマゼンタのシグナルはそのように並んだ視細胞のうちの SDC を表している。Fig. 11b,c の緑色のシグナルはすべてマゼンタのシグナルと重なる。これはつまり、GFP の発現している細胞がすべて SDC であることを示している。観察の対象としているのがトランジエントトランスジェニック個体であり、GFP 遺伝子は一部の細胞にしか取り込まれていないので、すべての SDC が GFP を発現する必要はない。実際 GFP を発現していない SDC が存在している(Fig. 11c)。(d)は(a)~(c)と同じ領域の光学切片を重ね合わせて得た立体図で、視細胞を横から捉えた画像である。オプシタンパク質は視細胞の外節膜部分に局在する(Fig. 1a)ので、抗 RH2 オプシン抗体によるシグナルは視細胞の外節膜部分にのみ現れる。それに対して GFP は外節膜部分にも分布するが主にそれ以外の部分に分布する。(d)の画像では、GFP の発現する細胞の形態が SDC の形態と一致すること、そして GFP のシグナルと RH2 オプシンのシグナルとの重なりが細胞の一番先の部分(外節膜部分)で見られることが分かる。

RH2-2 については、多くの GFP 蛍光が SDC で発現していることを確認できたが、視細胞層に位置するが SDC ではない細胞でも GFP が発現していた。Fig. 12 は網膜の裏側から視細胞層全体に渡って得た光学切片画像を重ね合わせたものである。よってこの領域に存

在するすべての SDC のシグナルが見えていると考えられる(Fig. 12a,c)。 (b)(c)で示した緑色の GFP シグナルの多くは SDC のシグナルと重なっている。しかし、矢印で示した GFP シグナルの細胞は SDC のシグナルとは重ならなかった。このことは断面図を見ることでも確認した(data not shown)。矢印の細胞は SDC と隣り合うように存在しており、SDC ではない別の視細胞であり、SDC 以外の細胞も GFP を発現していると結論付けた。RH2-3 についても、多くの GFP 蛍光が SDC で発現していることが確認できたが、RH2-2 のときと同様に、視細胞層にあるが SDC ではない細胞でも GFP が発現していた(Fig. 13)。RH2-4 については観察された GFP の蛍光はすべて SDC で発現していた(Fig. 14)。

これらの結果より、本来 RH2 オプシン遺伝子が発現していないはずの細胞でも一部 GFP の蛍光は見られたが、本実験で用いた 85kb の RH2 PAC クローンは RH2-1~RH2-4 の各オプシン遺伝子の SDC 特異的な発現を誘導するのに十分な制御領域を保持していて、さらにエクソン 1 を置換した GFP 遺伝子はその発現を再現できるものと考えられた。それぞれの RH2 サブタイプ遺伝子の網膜における発現領域の再現性については、今後これらの組み換え PAC クローンを保持したトランスジェニックラインを樹立して確認することが必要である。また、トランスジェニックラインを樹立した時に RH2-2 と RH2-3 について見られた SDC 以外の視細胞での発現が見られるかどうかにも検討する必要がある。

(3) RH2-RCR の RH2 オプシン遺伝子発現への影響

次に、RH2-RCR を欠失させ、上と同様に RH2-1~RH2-4 の各オプシン遺伝子を GFP で置換した PAC DNA コンストラクトをゼブラフィッシュにマイクロインジェクションした。これにより、RH2 オプシン遺伝子の発現が実際に RH2-RCR の影響を受けているかどうかを調べられると期待した。これまでの、RH2 オプシン遺伝子直上配列の発現誘導能とそれに RH2-RCR をつなげたコンストラクトの発現誘導能との比較だけでは、他の制御領域の存在を否定できない。また、RH2-4 については直上 1.3kb の配列に RH2-RCR をつけたコ

ンストラクトでは SDC に GFP の発現を誘導することはできなかった。この結果から他の制御領域が必要であることは推測できるが、その中で RH2-RCR が転写誘導に役割を担っているかどうかについては不明であった。

まず、RH2-RCR が存在する場合眼球で GFP 蛍光の観察できる 5dpf までに、眼球に GFP の蛍光が見られるかどうかを蛍光実体顕微鏡下で観察した。RH2-RCR の欠失したコンストラクトでは RH2-1 を GFP で置換した眼球で GFP の蛍光はまったく観察されなかった(41 個体)。RH2-2 については 46 個体調べてそのうち 8 個体には弱い GFP 蛍光が観察された。この強さは明らかに RH2-RCR が存在する場合に比べて弱かった。RH2-3 についてもいくつかの個体で眼球に GFP 蛍光がわずかに観察された(57 個体中 8 個体)。これもまた GFP 蛍光の強さは RH2-RCR が存在する場合に比べて弱かった。RH2-4 については眼球で GFP の蛍光は観察されなかった(50 個体)。RH2-1 と RH2-4 については弱い GFP 蛍光を見落としている危険性を考慮して、5 個体ずつについて眼球を摘出し、蛍光顕微鏡で観察したが、これらについてもまったく GFP 蛍光は見られなかった。これより、RH2-1 と RH2-4 についてはその発現に RH2-RCR が必要であると結論付けた。

RH2-2 と RH2-3 については RH2-RCR が欠失していても GFP が発現していた。GFP を発現している細胞が視細胞の short members of double cone (SDC)であるのかどうかを調べるために抗 RH2 オプシン抗体を用いて 7dpf の眼球に対して抗体染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。RH2-2 については、GFP の蛍光は SDC では発現していなかった(Fig. 15)。Fig. 15a で GFP が発現している細胞は視細胞層よりも網膜の内側にあることと、その形態から考えて水平細胞や双極細胞であると推測された。また、視細胞層にも GFP 蛍光は見られた(Fig. 15b)。RH2-2 の直上域だけで、双極細胞や桿体細胞に発現を誘導するというこれまでの実験結果と考え合わせると、この細胞が桿体細胞である可能性が考えられた。RH2-3 についても、GFP の蛍光は SDC のマーカーとは重ならなかった(Fig. 16)。RH2-2 と同様に双極細胞や水平細胞、桿体細胞らしき細胞で GFP の蛍光は見られた(Fig.

16) これらの結果から RH2-2 と RH2-3 についても、それらの SDC への発現には RH2-RCR が必要であると考えられた。

(4) RH2-RCR を RH1 上流 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
ゼブラフィッシュの紫外線型オプシン SWS1 遺伝子の開始コドンから上流-215bp と -110bp の領域を桿体オプシン RH1 遺伝子のプロモーター領域に挿入すると、そのプロモーター配列に short single cone (SSC; 紫外線型錐体視細胞) 特異性を与えられることが示されている(Luo et al., 2004)。また、松果体で特異的に発現する *exo-rhodopsin* 遺伝子の上流にある PIPE 配列を RH1 遺伝子のプロモーターに導入すると松果体発現能が与えられることが示されている(Asaoka et al., 2002)。私は、これらと同様に RH2-RCR に short members of double cone (SDC) 特異的な発現の誘導能があれば、RH1 遺伝子のプロモーター配列につなげることでエクトピクな SDC 発現誘導能を RH1 に与えることができるのではないかと期待した。RH1 の直上 1.1kb のプロモーター配列は桿体細胞特異的な転写を誘導することが知られている(Hamaoka et al., 2002)。そこで、Fig. 17 に示すような GFP レポーターコンストラクトを作製し、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、GFP が SDC で発現しているかどうかを抗 RH2 オプシン抗体を用いた抗体染色により調べた。まず、RH1 直上 1.1kb のみでは GFP の発現している細胞 24 個について調べたが、その中に SDC は観察されなかった(Fig. 18c)。それに対して RH1 の上流 1.1kb に RH2-RCR を付加したコンストラクトでは GFP の発現している細胞 70 個のうち 5 個が SDC であった(Fig. 18a,b)。この結果より RH2-RCR に SDC 特異性を誘導するための領域が含まれることが示唆された。

(5) RH2-RCR 制御配列特定の試み

RH2-RCR の中でどの配列が重要であるかを特定するためにこの領域を 2 つにわけて、そ

れぞれを PAC クローン上で欠失させた(Fig. 19)。具体的には、EcoR I サイトから Sac I サイトまでの 511bp のうち、5'側 241bp を FRT に置換したものと、3'側 269bp を FRT に置換したものとを作製した。RH2-1 を GFP に置換し、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たところ、どちらのコンストラクトにおいても眼球で GFP 蛍光が見られた個体はなかった。

(6) RH2-1<>GFP 組み換え PAC DNA コンストラクト導入トランスジェニックラインの樹立

RH2 PAC クローンの RH2-1 を GFP で置換したコンストラクトをマイクロインジェクションしたゼブラフィッシュの個体を成魚まで飼育し、トランスジェニックラインをスクリーニングした。生殖細胞系列に組み換え RH2 PAC DNA が導入され、眼球に GFP を発する幼魚を生むことができる 1 個体を確認できた。眼球以外で GFP が発現している組織は見られなかった(Fig. 20a)。眼球に GFP 蛍光を発する F1 幼魚について、眼球を摘出し抗 RH2 オプシン抗体を用いて抗体染色を行った。そして、GFP が short members of double cone (SDC) で特異的に発現しているのかということと、生後 1 週間から 2 週間の間に網膜の周縁部で RH2-1 が発現しなくなるという *in situ hybridization* の結果(Fig. 20b)を再現しているかどうかを調べたいと考えた。まず、9 days post fertilization (dpf)の個体から眼球を摘出して観察した(Fig. 20c-e)。Fig. 20c は共焦点レーザー顕微鏡により眼球全体にわたって光学切片画像を得て、それを立体的に再構築したものである。図で矢頭で示した部位は視神経が通るところであり、これにより眼球の腹側-背側軸の方向が分かる。網膜の中心領域では GFP が密に発現しているのが分かる。Fig. 20d は網膜の中心付近を平面的に観察したものである。まず、GFP が SDC においてのみ発現していることを確認できる。そして、ほとんどすべての SDC が GFP を発現していることが分かる。しかし、Fig. 20c で白点線で囲った領域は網膜背側の領域であるが、ここでは、GFP を発現していない SDC が多く見られ

る。Fig. 20e は網膜周縁部断面の光学切片画像で、これを見ても背側の領域で GFP を発現していない SDC が多いことが分かる。次に、2 weeks post fertilization (wpf)の眼球を摘出し同様の観察を行った。Fig. 20f は網膜周縁部断面の光学切片画像で、これを見ると背側の領域に加え腹側の領域においても GFP の発現が疎らになっているのがわかる。これらより、RH2-1 を置換した GFP は背側の領域でまず発現が消失し、その後腹側の領域でも発現の消失が始まったものと想像できる。そして、この結果はこの時期に網膜周縁部で RH2-1 の発現が消失するという *in situ hybridization* の結果(Fig. 20b)と一致する。以上より、GFP の発現が内在の RH2-1 の発現を正確に再現できていることが確認できた。

(7) LWS PAC クローンの改変

LWS 遺伝子の転写制御については、これまで直上域だけでは転写誘導ができないという結果であった(Luo et al., 2004)。そこで、私は LWS 遺伝子についても PAC クローンの各 LWS 遺伝子の位置にレポーター遺伝子を挿入し、それが各 LWS 遺伝子の発現パターンを再現できるかどうかを確認することから始めることにした。当研究室の *in situ hybridization* の実験より LWS-1 は網膜周縁部、特に腹側で発現し、LWS-2 は網膜の中心から背側にかけて発現することが分かっている(武智正樹 修士学位論文)。これらの領域的な使い分けを制御する仕組みも探ることを目的として、同じ PAC DNA 中で LWS-1 は GFP に LWS-2 は DsRed に置換することにした。また、Fig. 7 の制限酵素地図にある通り、LWS PAC クローンのインサート中には Not I 認識サイトが存在する。そのため、RH2 PAC クローンの時のように、PAC クローンを Not I で直鎖状にした後にマイクロインジェクションすると、PAC クローンを全長では保てない。そこで、LWS PAC クローンのベクターに新たに制限酵素認識サイトを導入することにした。メダカマイクロインジェクションにおいて 18 塩基認識エンドヌクレアーゼ I-SceI の認識サイトを両端に付加した DNA を I-SceI エンドヌクレアーゼと co-injection することによってトランスジェニックラインを樹

立できる効率が向上するという報告がある(Thermes et al., 2002)。これはゼブラフィッシュにおいても同様に成り立つことが示されている(Grabher et al., 2004)。そこで私は LWS の PAC クローンベクターに 2 つの I-SceI サイトを導入し、それを環状のまま I-SceI エンドヌクレアーゼと一緒にゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションすることにした。

まず、私は PAC クローンベクターのカナマイシン耐性遺伝子を I-SceI 認識サイトではさんだアンピシリン耐性遺伝子に置換した。これにより、PAC クローンからカナマイシン耐性が失われ逆にアンピシリン耐性が与えられた。そして、ベクターに 2 つの I-SceI 認識サイトが付加された。次に、LWS-2 遺伝子のエキソン 1 を DsRed-Km^r のカセットで置換し、さらに LWS-1 遺伝子のエキソン 1 を GFP-CAT のカセットで置換した(Fig. 21)。

(8) LWS PAC クローン改変コンストラクトのマイクロインジェクション

LWS PAC E、および LWS PAC H を改変して、LWS-1 と LWS-2 の位置に GFP と DsRed をそれぞれ導入したコンストラクトを I-SceI と co-injection した。蛍光顕微鏡(Axioplan 2: Carl Zeiss)で観察したところ、LWS PAC E、H どちらについても松果体および眼球で GFP と DsRed の発現が見られた(Fig. 22a-c)。当研究室で行われた whole-mount in situ hybridization により、LWS-1 と LWS-2 が松果体でも発現することが明らかにされており(武智正樹 修士学位論文)、GFP と DsRed が眼球だけでなく松果体でも発現することはその結果と一致する。DsRed の発現に比べて GFP は明らかに弱かった(蛍光を観察できる個体数が少なかった)。9dpf のトランジェントトランスジェニック個体から眼球を摘出し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した(Fig. 22d-i)。すると、GFP が発現している細胞と DsRed が発現している細胞はほとんどすべてで一致していた。その細胞は網膜の一番外側に位置し、網膜と垂直の向きに伸びていたことと、その形態とから視細胞であると推測された。だがその種類までは特定できなかった。GFP の発現は弱く、通常の蛍光顕微鏡では検出で

きないほどのものが多かったが、共焦点レーザー顕微鏡で感度を上げることで検出できた。DsRed の蛍光を GFP 用のフィルターが検出している可能性もある。そうでないことを確認するためには、DsRed のみを置換したコンストラクトをマイクロインジェクションして観察し、GFP のチャンネルで蛍光が検出されないことを確認するか、GFP に対する抗体を用いて抗体染色し、GFP の感度を特異的に上昇させることが必要だろう。次に、*in situ hybridization* の結果では LWS-1 は網膜の周縁部、特に腹側で発現し、LWS-2 は網膜中心から背側にかけて発現するので、GFP と DsRed がそれを再現するような傾向を示しているか観察した。しかし、GFP についても DsRed についても網膜の周縁部と中心部とで発現の程度に違いは認められなかった。サブタイプ間での発現領域の違いについて評価するには、RH2 遺伝子のときと同じように LWS 遺伝子についても組み換え PAC クローンを保持するトランスジェニックラインを樹立してから検討を始めるべきだろう。

4 . 考察

(1) PAC DNA 組換えコンストラクトにおけるレポーター遺伝子の発現

本研究では PAC クローンに GFP と DsRed のレポーター遺伝子を挿入してそれをそのままゼブラフィッシュに導入してレポーター遺伝子の発現を観察した。この方法を用いたのには 2 つの意義がある。1 つは、広い範囲に存在する転写制御領域を十分にカバーするためである。RH2 の Remote Control Region (RH2-RCR)として同定された領域が RH2-1 の上流 15kb に位置しているように、遺伝子の転写が数 10kb という大きな領域から制御を受けるのは一般的なことである。近年、マウスの中樞神経系で発現している遺伝子を BAC クローン中で GFP に置換し、その BAC クローンを保持するトランスジェニックマウスを複製し、その発現パターンをデータベース化するというプロジェクトも進行している(The Gene Expression Nervous System Atlas (GENSAT); <http://gensat.org/index.html>)(Gong et al., 2003)。これにより、神経細胞の可視化が可能になる。また、本来発現しているのに転写後調節の影響などで in situ hybridization や免疫組織染色では検出できない発現部位の特定につながると期待されている。このように、BAC や PAC クローン中で遺伝子をレポーター遺伝子で置換し、それを個体に導入するというのは遺伝子の発現をトレースする方法としてきわめて有効である。もう 1 つの意義として、本研究で研究対象としている RH2 および LWS オプシン遺伝子がタンデムに重複した遺伝子群を形成しており、それらサブタイプ間で転写が相互に調節されている可能性があり、それら遺伝子群の構造を維持したまま転写制御機構を解析することは重要である。そのためレポーターコンストラクトを複製する材料として PAC クローンをを用いることにした。

実際、本研究では RH2-1~RH2-4 および LWS-1、LWS-2 を GFP 遺伝子または DsRed 遺伝子に置換してその発現を解析した。RH2 遺伝子については、それが本来発現する錐体視細胞 short members of double cone (SDC)を染色する抗 RH2 オプシン抗体を用いて、GFP 遺伝子が SDC で発現しているかどうかを調べた。すると、RH2-1~RH2-4 のすべてに

ついて、置換した GFP 遺伝子は SDC で発現していた。よって本研究に用いた PAC クローンには SDC に発現を誘導するのに十分な転写制御領域が含まれており、今回相同組み換えにより作成した GFP 遺伝子挿入コンストラクトが正しく機能していると考えられる。特に、RH2-1 を GFP で置換した PAC DNA が導入されたトランスジェニックラインの解析結果 (Fig. 20) は、PAC クローンに挿入された GFP がきわめて正確に内在オプシン遺伝子の発現を再現できることを示唆している。ただし、いくつかの問題点は残っている。まず、本研究では主に DNA コンストラクトをインジェクションして、外来 DNA をトランジェントで保持しているだけの個体 (トランジェントトランスジェニック個体) について解析をしている。この実験系では、外来遺伝子を網膜の視細胞のすべてが持っているわけではないため、発現領域の解析はできない。また、眼球以外におけるエクトピックな GFP の発現も、トランジェントトランスジェニック個体で解析しているために起きていると考えられる。ゲノム DNA が細胞分化の過程でメチル化などの修飾を受けながら、遺伝子の活性状態は規定されていくので、発生段階の途中に導入された遺伝子が本来の発現パターンを示さないことはありえるだろう。実際、RH2-1 のトランスジェニックラインでは、眼球で GFP 蛍光が観察される F1 個体において他の組織での GFP の発現はみられなかった (Fig. 20a)。これは、生殖細胞系列から正しく遺伝子の活性化状態が制御されてきたためだと考えられる。次の問題点として、RH2-2 および、RH2-3 については、GFP の蛍光が網膜中の双極細胞や水平細胞、さらに SDC ではない視細胞において見られた (Fig. 12, 13)。これについては次の 3 つの解釈が成り立つ。ひとつは、PAC クローンにこれらの細胞における発現を抑制するための制御領域が備わっていないためだという解釈である。RH2-2 については上流 3.0kb だけ、もしくはそれに RH2-RCR を付加した配列で水平細胞や桿体細胞に発現が誘導される。本研究で PAC クローン全体を用いたことで、これらの細胞における発現が抑制されるのではないかと期待していたがそうはならなかった。2 つ目は、トランジェントトランスジェニック個体について観察しているためにエクトピックな発現が誘導されたという解釈である。

これについては、トランスジェニックラインを樹立したときに水平細胞や SDC でない視細胞において GFP の発現が見られるかどうかを調べることで解決する。3 つ目は抗体染色や *in situ hybridization* では検出されないが、これらの細胞でも RH2-2 および RH2-3 遺伝子の転写は行われているという解釈である。本研究の実験系では GFP 遺伝子に外来の polyA 付加シグナルをつなげたものを用いており、GFP の発現は転写活性自体を反映するもので、内在の遺伝子が受けるはずの転写後調節は反映されない。その違いがこの実験結果に現れているという解釈である。桿体オプシン（ロドプシン）としての機能を維持した桿体オプシン-GFP 融合タンパク質をアフリカツメガエル生体内で発現させた例が報告されている (Jin et al., 2003)。RH2-2 や RH2-3 との融合タンパク質として GFP を発現させそれを観察することによりこれらの影響を評価できるかもしれない。RH2-4 については今回初めてその発現を再現できた。これまでは直上域やそれに RH2-RCR を付加した配列では SDC における発現を誘導できなかったが、PAC クローンには RH2-4 の発現を誘導するのに十分な領域が含まれていたことが分かった。

LWS 遺伝子については組み換え PAC クローンにより視細胞と思われる細胞にレポーター遺伝子を発現させることができた。この細胞が *long members of double cone* (LDC) であるとしたら、ゼブラフィッシュの LWS 遺伝子の LDC での発現を初めて誘導できたことになる。今後 RH2 において行ったのと同様に抗 LWS オプシン抗体による抗体染色で、それらの細胞が LDC であるかどうか調べる必要がある。*in situ hybridization* で示された LWS 遺伝子のサブタイプの発現パターンから、LWS-1 と LWS-2 は網膜上で領域を区分して使い分けがなされていることが知られている (Fig. 3)。これより LWS-1 と LWS-2 の発現は1つの視細胞において排他的に起きていると考えていたが、今回の結果はそうはならず、ほとんどすべての DsRed と GFP の発現が同一の細胞で起きていた。トランスジェニックラインを樹立してからの解析を待つべきだが、この結果は LDC が LWS-1 も LWS-2 も発現させるポテンシャルを持つことを示唆する結果である。その上で *in situ hybridization* で見られ

たような排他的な領域の使い分けがどのようにして行われているのかという問題は興味深い。

(2) RH2-RCR の機能について

これまで、RH2-RCR の機能として分かっていたことは RH2-1 および RH2-2 の直上配列とつなげることで SDC における発現を誘導できるということだけであった。RH2-3 や RH2-4 における RH2-RCR の役割は不明であり、また、RH2-1 と RH2-2 においても RH2-RCR 以外にその機能を補えるような制御領域が存在する可能性を否定できていなかった。本研究では PAC クローンを用いてそれらの疑問を解決しようと試みた。

まず、RH2-RCR が存在する RH2 PAC クローンが RH2-1~RH2-4 のすべてについて SDC での発現を誘導できることは、GFP 組み換えコンストラクトを用いた実験で示された。次に、RH2-RCR を欠失させたときの変化を観察したところ、RH2-1~RH2-4 のすべてで SDC に発現を誘導できなくなった。これにより、RH2-RCR が RH2 遺伝子群に対して LCR として機能していて、RH2-1~RH2-4 のすべての発現に必要な領域であることが示された。RH2-1 および RH2-2 については、他に RH2-RCR を補える領域がないことが明らかになった。RH2-3 および RH2-4 については、これまでそれらの発現に RH2-RCR が影響することを示唆する結果はなかったが、今回 RH2-RCR が必須であることが明らかになった。特に意外であったのは RH2-3 についての結果である。これまで、RH2-3 の上流域のみで SDC の発現が誘導できることが示されていた。これと考え合わせると、RH2-3 の上流域には SDC における発現に必要な因子が含まれているが、それが RH2 遺伝子群における本来の位置にある場合、その活性は抑えられている。そして、それとは別に RH2-RCR と RH2-3 の直上域との相互作用により RH2-3 の発現は誘導されているという機構が想定できる。

また、RH2-RCR を RH1 の直上 1.1kb とつなげたキメラ DNA コンストラクトが SDC における発現を誘導したことから、RH2-RCR には short members of double cone (SDC)特異

性を規定する領域があることが示唆された。実際には、RH2-RCR は RH2 各遺伝子の直上プロモーターと相互作用することで下流の遺伝子の発現を誘導していると考えられる。そのときの相互作用の特異性については不明である。RH2-RCR が RH2 遺伝子に限らず広く作用するものであるかもしれないし、RH2 の上流に対して特に強く働くものかもしれない。そしてサブタイプ間でその作用の大きさに違いがあるのかもしれない。また、RH2 各遺伝子の直上プロモーターにも SDC 特異性の決定に関わる因子が存在することは考えられる。RH2-3 の直上域がそれだけで SDC 特異的な発現を誘導できることはその可能性を示唆する。これらを明らかにするためには、RH2-RCR、RH2 各遺伝子の直上プロモーターそれぞれにおいて制御領域の絞込みを行い、それらの役割を一つ一つ検討していくことが必要であろう。本研究では PAC クローン上で RH2-RCR を半分ずつ欠失させて、RH2-1 の転写活性がどう変化するかを見た。RH2-RCR を半分に分けたときに、どちらかのみで制御領域が含まれていると考えると、その半分の欠失させたときのみ GFP の蛍光は観察されなくなると考えられる。しかし、結果はそうならずどちらを欠失させたときも GFP の蛍光は観察されなかった。制御領域が両半分に分断されて存在しているか、半分に分けた境界上に存在しているためだろうと考えている。今後は欠失の範囲をより小さくして同様の実験を行うことで、制御領域の絞込みを行う予定である。RH2 各遺伝子の直上域についても制御配列の絞込みを同様に進めていきたいと考えている。そして、それらの役割、特に RH2-RCR との関わりについて解析していくつもりである。

(3) ゼブラフィッシュ RH2 遺伝子群および LWS 遺伝子群の発現制御機構について

本研究により、ゼブラフィッシュ RH2 遺伝子群の発現制御において、RH2-1 の上流 15kb に位置する RH2-RCR が LCR として機能していることを明らかにできた。ゼブラフィッシュ RH2 遺伝子について系統樹を作成すると、RH2-1 と RH2-2 のクラスターと RH2-3 と RH2-4 の 2 つのクラスターに分かれる(Chinen et al., 2003)。網膜における発現領域は

RH2-1 と RH2-2 が中央から背側にかけて発現しており、RH2-3 と RH2-4 が網膜周縁部、特に腹側の領域で発現している。これらの事実より、その発現制御機構についても RH2-1 と RH2-2 のグループと RH2-3 と RH2-4 のグループとに分けられることが予想される。その上で RH2-1~RH2-4 のすべての遺伝子が同一の LCR により制御を受けているのは興味深い。RH2-RCR はおそらく RH2 各遺伝子の上流域と相互作用しながら、転写を誘導しているものと推察できる。LCR のこの制御機構の仮定が正しいとすると、ひとつの RH2-1~RH2-4 の遺伝子クラスターからはひとつの遺伝子のみが発現していることが期待される。これを明らかにするには本研究で用いた PAC DNA 組み換えコンストラクトを単コピーで保持するようなトランスジェニックラインを樹立することが有効であろう。対立遺伝子が存在するため、ひとつの遺伝子クラスターからはひとつのサブタイプのみを発現するというこの機構だけでは同じ視細胞に複数サブタイプの RH2 遺伝子が発現する可能性はある。実際どうであるのかがまだ分かっていないため何ともいえないが、RH2-1,-2 のグループと RH2-3,-4 のグループとで発現領域に明確な差が見られることから、これら 2 グループの間で RH2-RCR との相互作用の仕方に明確な違いがあるのではないかと考えている。これに関して、本研究で樹立した RH2-1 の GFP 組み換え PAC DNA のトランスジェニックラインの解析結果は興味深いことを示唆している。まず、GFP 遺伝子は生後 2 週間において網膜の周縁領域で発現が消失しており、これは *in situ hybridization* の結果とよく一致していた(Fig. 20)。GFP 遺伝子によるレポーター系は転写活性を反映する系であるので、この結果は RH2-1 の発現領域の調節が転写レベルで行われていることを強く示唆するものである。そして、GFP が発現しなかった網膜周縁の領域では RH2-3、RH2-4 が発現しているはずで、RH2-3,4 のグループと RH2-1 との間には決定的に異なる転写調節機構が存在している可能性が示唆される。さらに、網膜の中央領域では GFP はほとんどすべての *short members of double cone (SDC)* で発現していた(Fig. 20d)。*in situ hybridization* の結果によれば、網膜の中央領域では RH2-2 も発現しているはずで、この結果は RH2-1 と RH2-2

とが同一の視細胞から発現されうることを示唆している。そしてそれは RH2-1 と RH2-2 のそれぞれの発現制御機構の間に多くの共通性が存在していることを示唆している。

RH2 遺伝子群における LCR による発現制御機構は序論でも述べたヒトの M/LWS 遺伝子の発現制御機構を想起させる。オプシン遺伝子の進化系統樹により脊椎動物の共通祖先は 4 グループすべてのオプシン遺伝子を持っていたと推測されている (Yokoyama and Yokoyama, 1996)。哺乳類は夜行性であった時代に進化の過程で SWS2 と RH2 の 2 グループのオプシン遺伝子を失い 2 色型色覚となった。その後、霊長類の狭鼻猿類においては M/LWS 遺伝子を重複させ、それを機能分化させることで 3 色型色覚となった (Jacobs, 1995)。ここでその重複により生じた赤オプシン遺伝子と緑オプシン遺伝子は互いに異なる視細胞で発現しているが、それは、前述したように LCR による転写制御機構の存在とこれらの遺伝子が X 染色体上に位置することにより成立している。ヒトの M/LWS 遺伝子群のこの機構は、レパートリーの増減に対しても色覚成立に不可欠な 1 視細胞 1 視物質の原則を保持できる点で興味深い。

また、嗅覚系における嗅覚受容体の発現においても興味深い制御機構が存在している。マウスの嗅覚受容体遺伝子はゲノム上で巨大なファミリーを形成しており、その数は 1500 と概算されている (Young and Trask, 2002; Zhang and Firestein, 2002)。嗅上皮の 1 つの嗅神経細胞は網膜における視細胞と同様にある特定の 1 種の嗅覚受容体に対立遺伝子の片方からのみ発現している (Chess et al., 1994; Malnic et al., 1999)。これによって受容体レベルで行われる匂い物質の識別が細胞レベルでも維持され、それが神経伝達によりより高次のレベルで解析されている。この巨大な嗅覚受容体遺伝子ファミリーの中から一つの対立遺伝子のみが選択的に発現する機構は長く不明であったが、最近の研究で明らかになってきた (Serizawa et al., 2004)。まず、嗅覚受容体の発現はヒトの M/LWS オプシン遺伝子におけるのと同じように LCR によって制御されていて、これによってクラスター内のある一つの遺伝子のみが発現する。さらに、対立遺伝子群や他のクラスターからの発現を制御す

る機構として、成熟した嗅覚受容体タンパク質が発現されると他のアリルからの発現を抑制している(Serizawa et al., 2003)。最初は、確率的にある(いくつかの)遺伝子の発現が開始され、その後そのひとつの成熟受容体タンパク質ができるようになったら、他のアリルからの発現が完全に抑制され、1 嗅細胞 1 受容体が達成されるというものである(Shykind et al., 2004)。この機構もまた、遺伝子の書き換えや重複によるレパートリーの増減に対して 1 嗅細胞 1 受容体ルールが乱されないという点で興味深い。

ゼブラフィッシュの LWS や RH2 遺伝子も重複によりサブタイプを生じ、その後機能分化したという点でヒトの M/LWS と類似している。しかし、その機能分化の意味は異なっていると考えられる。ヒトにおいては、M/LWS の重複により 2 色型色覚から 3 色型色覚に進化し波長識別能が向上した。それに対してゼブラフィッシュでは、網膜における領域的な使い分けが果たされている。ヒトの M/LWS 遺伝子群における発現遺伝子の選択も嗅覚受容体遺伝子ファミリーからの発現遺伝子の選択も確率的なものであった。これは、進化的なレパートリーの増減に対応するという意味を考えれば合理的な機構である。これに対してゼブラフィッシュの LWS や RH2 遺伝子群では領域や時間によって発現遺伝子が規定されているという意味で厳密な制御機構が存在していると想像でき、この進化過程の解明は新たな興味深い知見となるだろう。本研究で、RH2 遺伝子群については RH2-RCR という LCR によって制御されていることが明らかになった。LWS 遺伝子群についてはまだその制御機構はほとんど明らかになっていないが、今後は、本研究の知見をもとにこれら重複遺伝子群の発現制御機構をさらに解明していきたいと考えている。

5 . 謝辞

まず始めに、東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻人類進化システム分野の河村正二助教授に厚く御礼申し上げます。河村正二助教授は大変興味深くやりがいのある研究テーマを私に与えてくださり、研究を行うにあたっては熱心なご指導をいただきました。ここに感謝いたします。

National Cancer Institute-Frederick の Neal. G Copeland 博士には大腸菌株 DY380 及び EL250 を御分与していただきました。厚く御礼申し上げます。ノートルダム大学の T. Vihtelic 博士と D. Hyde 博士には抗 RH2 オプシン抗体を御分与いただきました。厚く御礼申し上げます。

実験機器を快く貸して下さった当専攻の医薬デザイン工学分野・植物生存システム分野の皆様にご礼申し上げます。

私をここまで育ててくださり、私のよき理解者であって下さった私の両親に感謝いたします。

最後に、研究生生活のすべてにおいて私を励まし助けて下さりました人類進化システム分野の皆様にご礼申し上げます。

多くの人の支えがあってこの修士論文を完成させることができました。本当にありがとうございました。

6 . 引用文献

- Asaoka, Y., Mano, H., Kojima, D. and Fukada, Y.: Pineal expression-promoting element (PIPE), a cis-acting element, directs pineal-specific gene expression in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 15456-61.
- Branchek, T. and Bremiller, R.: The development of photoreceptors in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. I. Structure. *J Comp Neurol* 224 (1984) 107-15.
- Chen, J., Tucker, C.L., Woodford, B., Szel, A., Lem, J., Gianella-Borradori, A., Simon, M.I. and Bogenmann, E.: The human blue opsin promoter directs transgene expression in short-wave cones and bipolar cells in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 2611-5.
- Chen, S., Wang, Q.L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A. and Zack, D.J.: Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* 19 (1997) 1017-30.
- Chen, S. and Zack, D.J.: Ret 4, a positive acting rhodopsin regulatory element identified using a bovine retina in vitro transcription system. *J Biol Chem* 271 (1996) 28549-57.
- Cheng, H., Khanna, H., Oh, E.C., Hicks, D., Mitton, K.P. and Swaroop, A.: Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors. *Hum Mol Genet* 13 (2004) 1563-75.
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H. and Axel, R.: Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 78 (1994) 823-34.
- Chinen, A., Hamaoka, T., Yamada, Y. and Kawamura, S.: Gene duplication and spectral diversification of cone visual pigments of zebrafish. *Genetics* 163 (2003) 663-75.
- Chiu, C.H., Amemiya, C.T., Carr, J.L., Bhargava, J., Hwang, J.K., Shashikant, C.S., Ruddle, F.H. and Wagner, G.P.: A recombinogenic targeting method to modify large-inserts for cis-regulatory analysis in transgenic mice: construction and expression of a 100-kb, zebrafish Hoxa-11b-lacZ reporter gene. *Dev Genes Evol* 210 (2000) 105-9.
- Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Court, D.L.: Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet* 2 (2001) 769-79.
- DesJardin, L.E. and Hauswirth, W.W.: Developmentally important DNA elements within the bovine opsin upstream region. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (1996) 154-65.
- Furukawa, T., Morrow, E.M. and Cepko, C.L.: Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91 (1997) 531-41.

- Furukawa, T., Morrow, E.M., Li, T., Davis, F.C. and Cepko, C.L.: Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice. *Nat Genet* 23 (1999) 466-70.
- Gong, S., Zheng, C., Doughty, M.L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U.B., Nowak, N.J., Joyner, A., Leblanc, G., Hatten, M.E. and Heintz, N.: A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425 (2003) 917-25.
- Grabher, C., Joly, J.S. and Wittbrodt, J.: Highly efficient zebrafish transgenesis mediated by the meganuclease I-SceI. *Methods Cell Biol* 77 (2004) 381-401.
- Hamaoka, T., Takechi, M., Chinen, A., Nishiwaki, Y. and Kawamura, S.: Visualization of rod photoreceptor development using GFP-transgenic zebrafish. *Genesis* 34 (2002) 215-20.
- Jacobs, G.H.: Variations in primate color vision: Mechanisms and utility. *Evolutionary anthropology* 3 (1995) 196-205.
- Jessen, J.R., Meng, A., McFarlane, R.J., Paw, B.H., Zon, L.I., Smith, G.R. and Lin, S.: Modification of bacterial artificial chromosomes through chi-stimulated homologous recombination and its application in zebrafish transgenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 5121-6.
- Jessen, J.R., Willett, C.E. and Lin, S.: Artificial chromosome transgenesis reveals long-distance negative regulation of rag1 in zebrafish. *Nat Genet* 23 (1999) 15-6.
- Jin, S., McKee, T.D. and Oprian, D.D.: An improved rhodopsin/EGFP fusion protein for use in the generation of transgenic *Xenopus laevis*. *FEBS Lett* 542 (2003) 142-6.
- Kennedy, B.N., Vihtelic, T.S., Checkley, L., Vaughan, K.T. and Hyde, D.R.: Isolation of a zebrafish rod opsin promoter to generate a transgenic zebrafish line expressing enhanced green fluorescent protein in rod photoreceptors. *J Biol Chem* 276 (2001) 14037-43.
- Kumar, R., Chen, S., Scheurer, D., Wang, Q.L., Duh, E., Sung, C.H., Rehemtulla, A., Swaroop, A., Adler, R. and Zack, D.J.: The bZIP transcription factor Nrl stimulates rhodopsin promoter activity in primary retinal cell cultures. *J Biol Chem* 271 (1996) 29612-8.
- Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G.: A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73 (2001) 56-65.
- Lin, C.Y., Chen, Y.H., Lee, H.C. and Tsai, H.J.: Novel cis-element in intron 1 represses somite expression of zebrafish myf-5. *Gene* 334 (2004) 63-72.

- Livesey, F.J., Furukawa, T., Steffen, M.A., Church, G.M. and Cepko, C.L.: Microarray analysis of the transcriptional network controlled by the photoreceptor homeobox gene *Crx*. *Curr Biol* 10 (2000) 301-10.
- Luo, W., Williams, J., Smallwood, P.M., Touchman, J.W., Roman, L.M. and Nathans, J.: Proximal and distal sequences control UV cone pigment gene expression in transgenic zebrafish. *J Biol Chem* 279 (2004) 19286-93.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. and Buck, L.B.: Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96 (1999) 713-23.
- Mani, S.S., Batni, S., Whitaker, L., Chen, S., Engbretson, G. and Knox, B.E.: *Xenopus* rhodopsin promoter. Identification of immediate upstream sequences necessary for high level, rod-specific transcription. *J Biol Chem* 276 (2001) 36557-65.
- Meng, A., Jessen, J.R. and Lin, S.: Transgenesis. *Methods Cell Biol* 60 (1999) 133-48.
- Mitton, K.P., Swain, P.K., Chen, S., Xu, S., Zack, D.J. and Swaroop, A.: The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation. *J Biol Chem* 275 (2000) 29794-9.
- Moritz, O.L., Peck, A. and Tam, B.M.: *Xenopus laevis* red cone opsin and *Prph2* promoters allow transgene expression in amphibian cones, or both rods and cones. *Gene* 298 (2002) 173-82.
- Nathans, J., Davenport, C.M., Maumenee, I.H., Lewis, R.A., Hejtmancik, J.F., Litt, M., Lovrien, E., Weleber, R., Bachynski, B., Zwas, F. and et al.: Molecular genetics of human blue cone monochromacy. *Science* 245 (1989) 831-8.
- Raymond, P.A., Barthel, L.K., Rounsifer, M.E., Sullivan, S.A. and Knight, J.K.: Expression of rod and cone visual pigments in goldfish and zebrafish: a rhodopsin-like gene is expressed in cones. *Neuron* 10 (1993) 1161-74.
- Rehemtulla, A., Warwar, R., Kumar, R., Ji, X., Zack, D.J. and Swaroop, A.: The basic motif-leucine zipper transcription factor *Nrl* can positively regulate rhodopsin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 191-5.
- Serizawa, S., Miyamichi, K., Nakatani, H., Suzuki, M., Saito, M., Yoshihara, Y. and Sakano, H.: Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* 302 (2003) 2088-94.
- Serizawa, S., Miyamichi, K. and Sakano, H.: One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends Genet* 20 (2004) 648-53.
- Shykind, B.M., Rohani, S.C., O'Donnell, S., Nemes, A., Mendelsohn, M., Sun, Y., Axel, R. and Barnea, G.: Gene switching and the stability of odorant receptor gene choice. *Cell* 117 (2004) 801-15.
- Smallwood, P.M., Wang, Y. and Nathans, J.: Role of a locus control region in the mutually

- exclusive expression of human red and green cone pigment genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 1008-11.
- Swaroop, A., Xu, J.Z., Pawar, H., Jackson, A., Skolnick, C. and Agarwal, N.: A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 266-70.
- Takechi, M., Hamaoka, T. and Kawamura, S.: Fluorescence visualization of ultraviolet-sensitive cone photoreceptor development in living zebrafish. *FEBS Lett* 553 (2003) 90-4.
- Thermes, V., Grabher, C., Ristoratore, F., Bourrat, F., Choulika, A., Wittbrodt, J. and Joly, J.S.: I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech Dev* 118 (2002) 91-8.
- Vihtelic, T.S., Doro, C.J. and Hyde, D.R.: Cloning and characterization of six zebrafish photoreceptor opsin cDNAs and immunolocalization of their corresponding proteins. *Vis Neurosci* 16 (1999) 571-85.
- Wang, Q.L., Chen, S., Esumi, N., Swain, P.K., Haines, H.S., Peng, G., Melia, B.M., McIntosh, I., Heckenlively, J.R., Jacobson, S.G., Stone, E.M., Swaroop, A. and Zack, D.J.: QRX, a novel homeobox gene, modulates photoreceptor gene expression. *Hum Mol Genet* 13 (2004) 1025-40.
- Wang, Y., Macke, J.P., Merbs, S.L., Zack, D.J., Klaunberg, B., Bennett, J., Gearhart, J. and Nathans, J.: A locus control region adjacent to the human red and green visual pigment genes. *Neuron* 9 (1992) 429-40.
- Wang, Y., Smallwood, P.M., Cowan, M., Blesh, D., Lawler, A. and Nathans, J.: Mutually exclusive expression of human red and green visual pigment-reporter transgenes occurs at high frequency in murine cone photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 5251-6.
- Westerfield, M.: *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio Rerio)*. University of Oregon Press, 1995.
- Whitaker, S.L. and Knox, B.E.: Conserved transcriptional activators of the *Xenopus* rhodopsin gene. *J Biol Chem* 279 (2004) 49010-8.
- Yokoyama, S.: Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Prog Retin Eye Res* 19 (2000) 385-419.
- Yokoyama, S. and Yokoyama, R.: adaptive evolution of photoreceptors and visual pigments in vertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27 (1996) 543-567.
- Young, J.M. and Trask, B.J.: The sense of smell: genomics of vertebrate odorant receptors. *Hum Mol Genet* 11 (2002) 1153-60.
- Yu, D., Ellis, H.M., Lee, E.C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. and Court, D.L.: An efficient

recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 5978-83.

Yu, X. and Barnstable, C.J.: Characterization and regulation of the protein binding to a cis-acting element, RET 1, in the rat opsin promoter. *J Mol Neurosci* 5 (1994) 259-71.

Zhang, X. and Firestein, S.: The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci* 5 (2002) 124-33.

知念秋人： A Study of the Spectral Tuning and the Cell Type Specific Expressional Regulation of Zebrafish Visual Pigments for Elucidation of the Evolution of Color Vision

平成 15 年度 当専攻博士学位論文

武智正樹： ゼブラフィッシュ桿体型・紫外線型視物質遺伝子の発現制御領域および赤型・緑型視物質遺伝子の発現プロファイルの検討

平成 15 年度 当専攻修士学位論文

7 . 图表

Table 1

GFP 遺伝子結合 DNA コンストラクトのゼブラフィッシュへの導入により RH2 直上域の転写誘導能を調べた実験結果

遺伝子	直上域のみ	RH2-RCR 付加
RH2-1	GFP 発現誘導されない。	SDC で GFP 発現。領域は中心付近のみ。 (in situ hybridization の結果と一致する。)
RH2-2	一部の双極細胞と桿体細胞で GFP 発現。 SDC では GFP 発現しない。	SDC で GFP 発現。領域は中心から背側にかけて。 (in situ hybridization の結果と一致する。) 一部の双極細胞と桿体細胞でも GFP 発現。
RH2-3	SDC で GFP 発現。領域は中心付近。 (in situ hybridization の結果とは一致しない。)	SDC で GFP 発現。領域は中心付近。 (RH2-RCR の付加による影響なし。)
RH2-4	GFP 発現しない。	GFP 発現しない。 (RH2-RCR の付加による影響なし。)

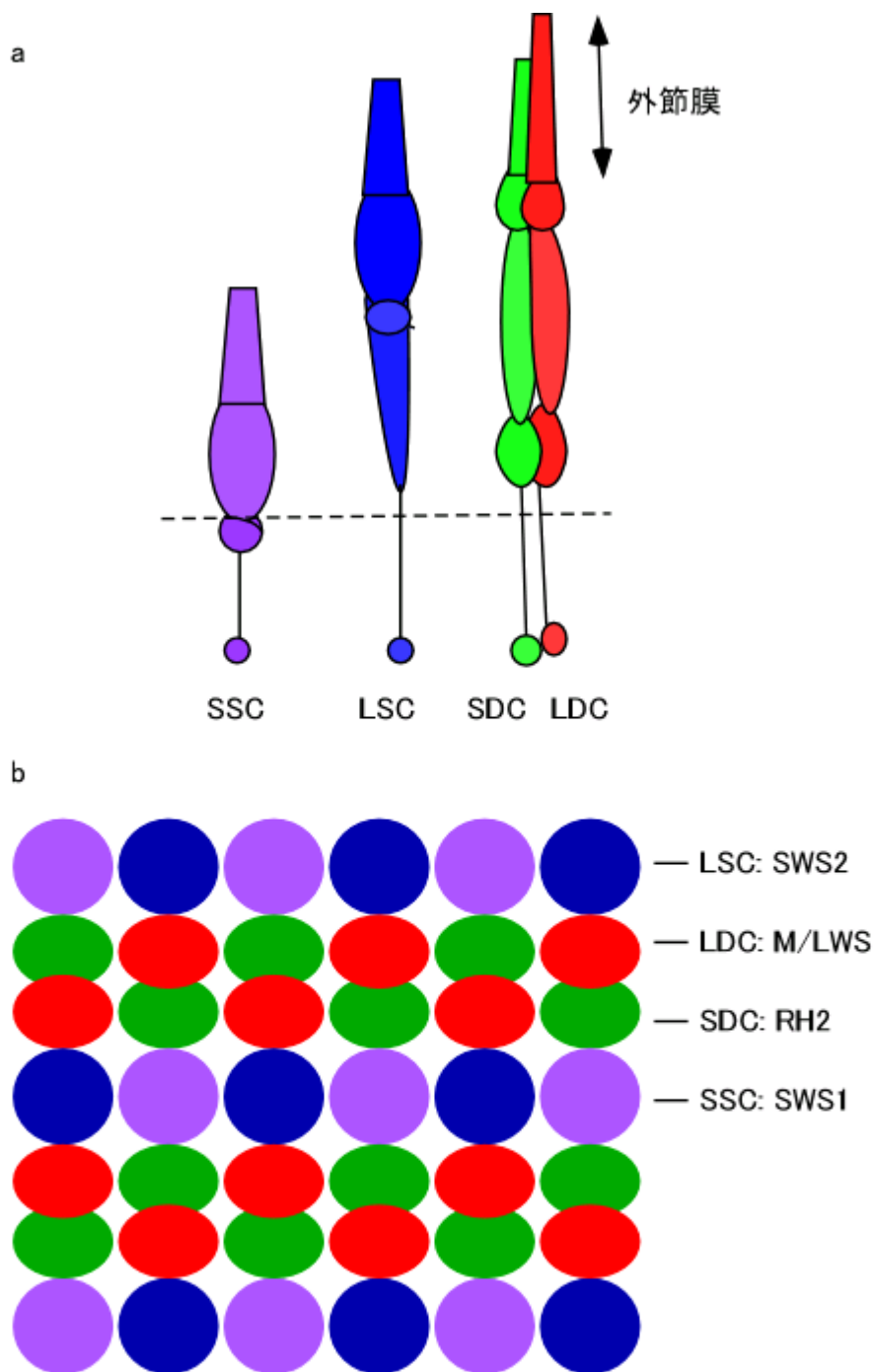


Fig. 1

ゼブラフィッシュ錐体視細胞の模式図

(a)4種類の錐体視細胞を網膜の断面方向から見た図。両矢印で示した外節膜中に視物質が局在する。(b)網膜を平面からとらえたときの錐体視細胞の並びを示した図。各錐体視細胞は1種類の視物質のみを特異的に発現している。LSC: long single cone, LDC: long members of double cone, SDC: short members of double cone, SSC: short single cone。

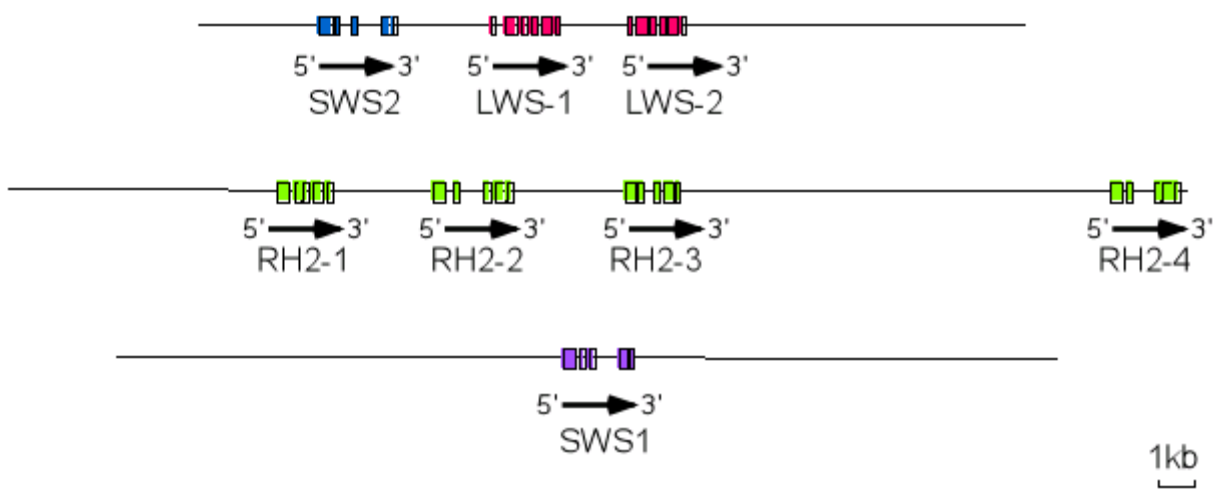


Fig. 2
 ゼブラフィッシュ全錐体視物質遺伝子のゲノム構造
 LWSには2つ、RH2には4つのサブタイプ遺伝子が存在する。

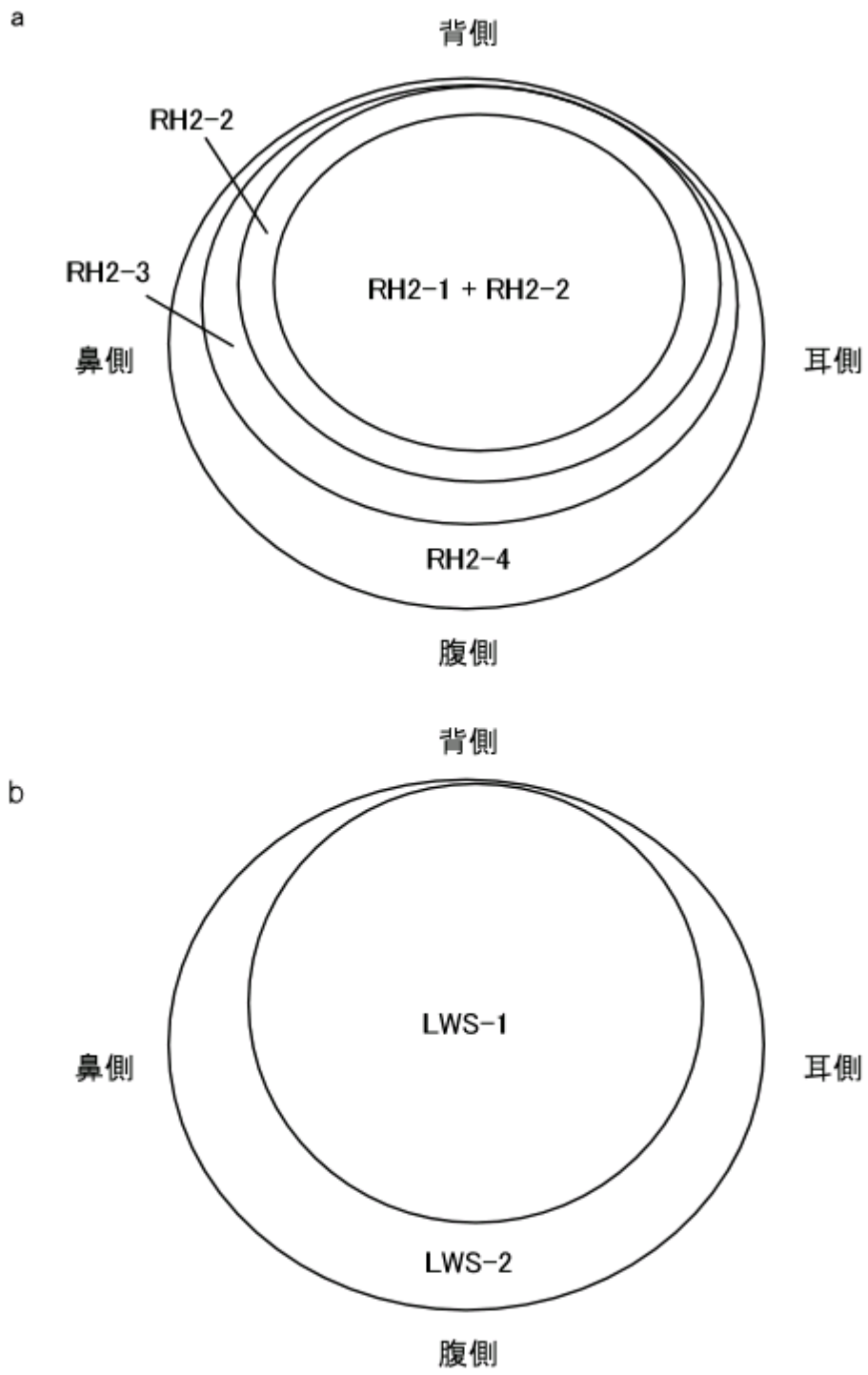


Fig. 3
 ゼブラフィッシュ成魚網膜におけるRH2およびLWSサブタイプ遺伝子の発現分布
 (a)RH2. (b)LWS.

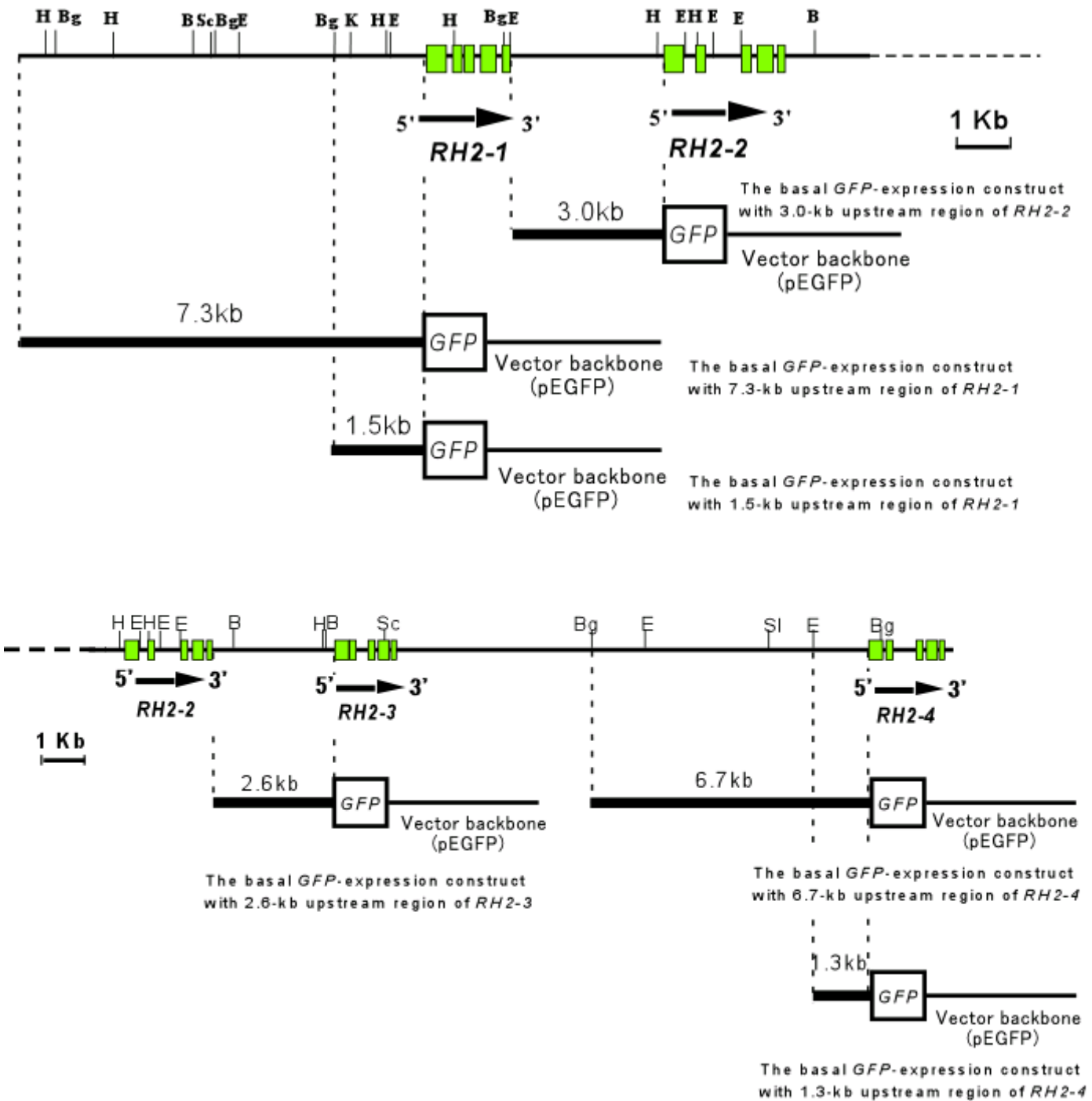
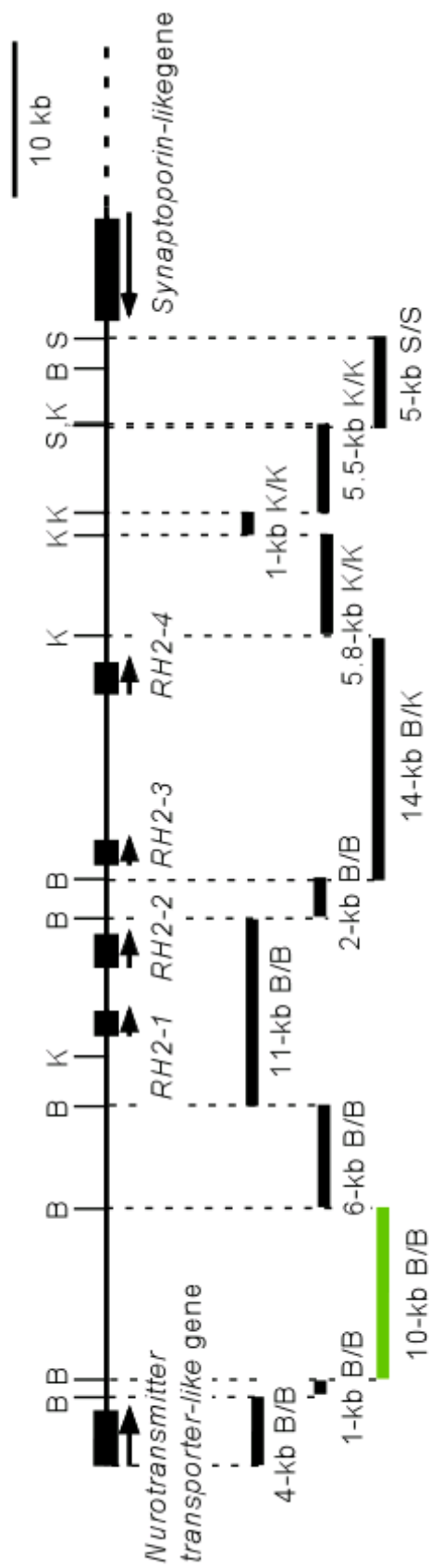


Fig. 4
RH2各オプシン遺伝子上流配列をGFPにつなげたコンストラクト。

a



b

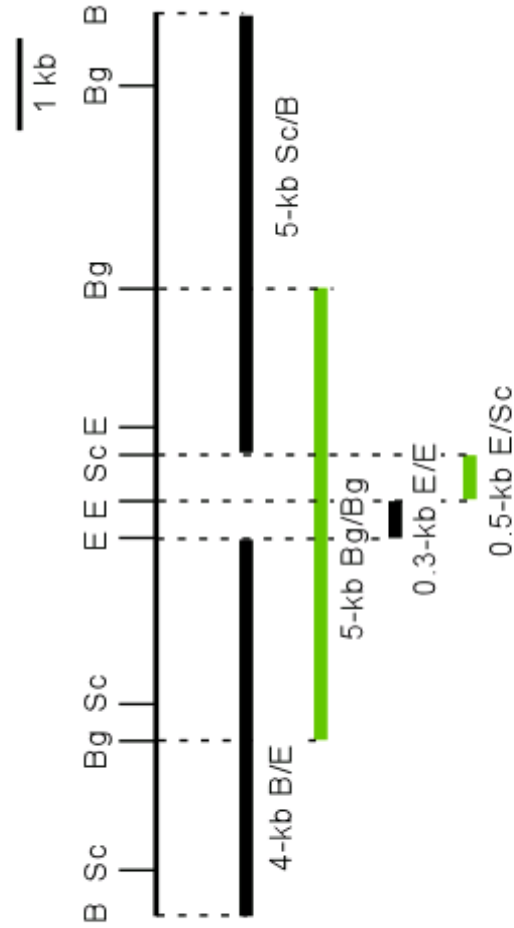


Fig. 5
 RH2-1直上1.5kbにGFP遺伝子をつなげたコンストラクトとRH2 PACクローン制限酵素断片とのco-injection
 緑色に示した断片はco-injectionにおいてGFP遺伝子の発現を誘導できたことを示す。(a)はRH2 PACクローン全長。
 (b)はBamH IIによる10kbの断片。B: BamH I, K: Kpn I, S: Sal I, Bg: Bgl II, Sc: Sac I, E: EcoR I

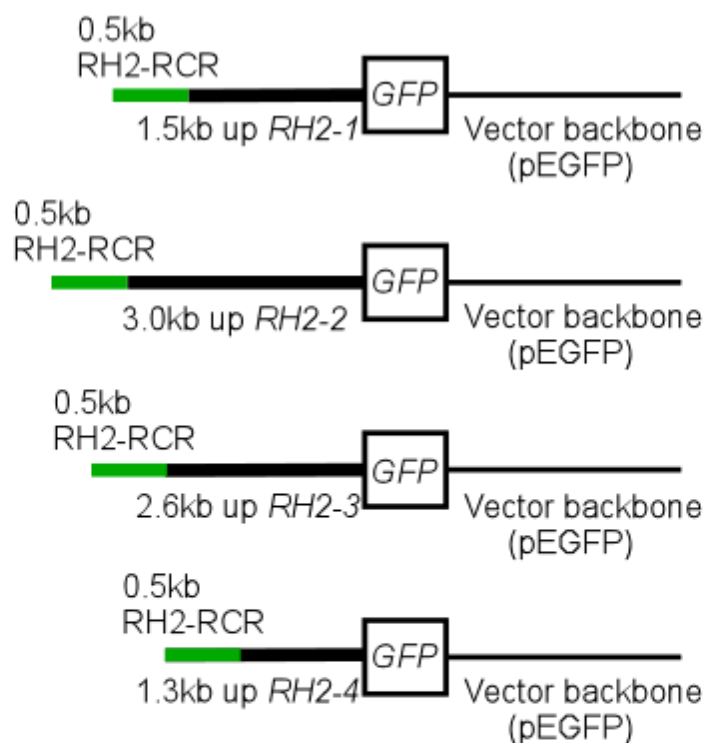


Fig. 6
RH2各オブシン遺伝子の直上配列にRH2-RCRを付加したものにGFPをつなげたコンストラクト。

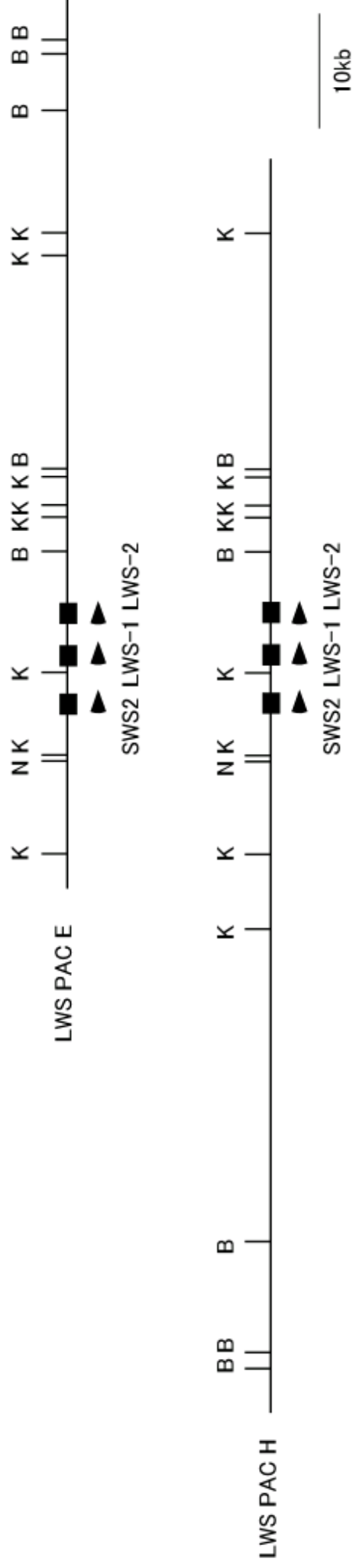


Fig. 7
 LWS PACクローンの制限酵素地図
 B: BamH I, K: Kpn I, N: Not I

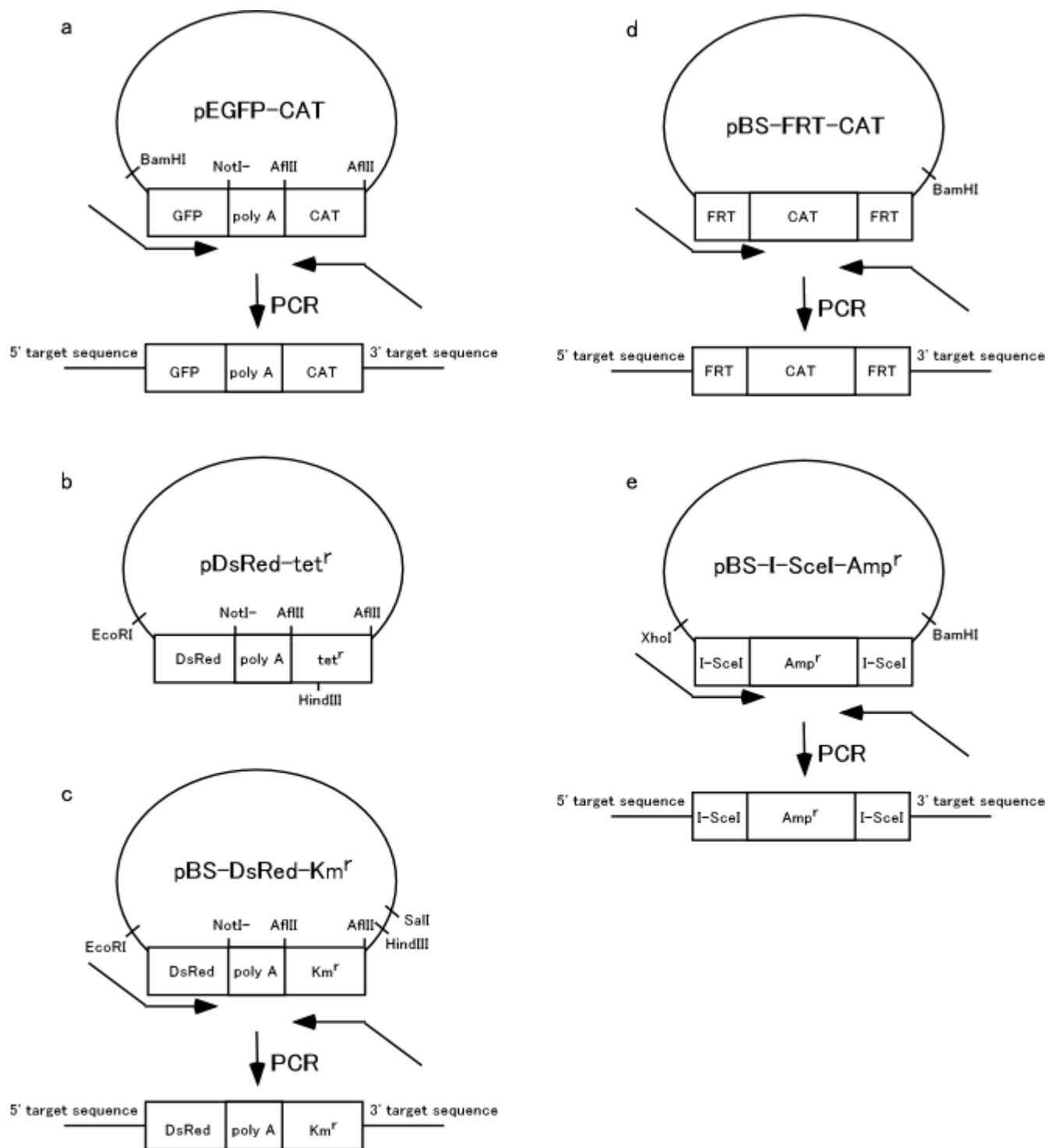


Fig. 8
 PAC組み換え用ターゲッティングDNA断片の作製
 各種プラスミドを作製し、それらをテンプレートとして、両端にターゲットシーケンスを付加したプライマーによりPCRした。

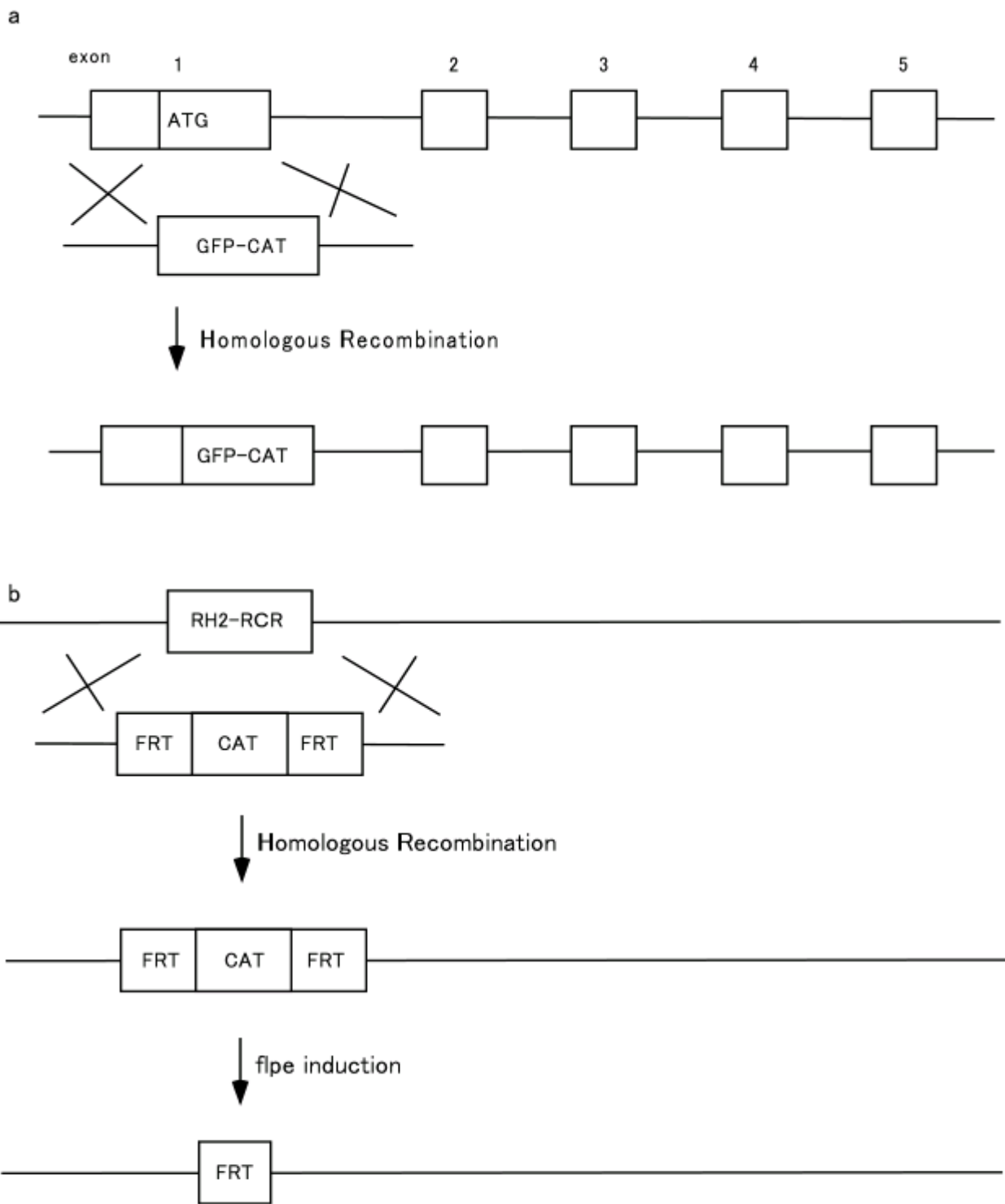


Fig. 9
 PACクローンの改変
 (a)オプシン遺伝子は開始コドン以下のエキソン1を相同組み換えによりGFP-CATまたはDsRed-Km^rのカセットに置換した。(b)RH2 PACクローンのRH2-RCRは相同組み換えによりFRT-CAT-FRTのカセットに置換した後、flpeの誘導によりCAT遺伝子を切り出した。

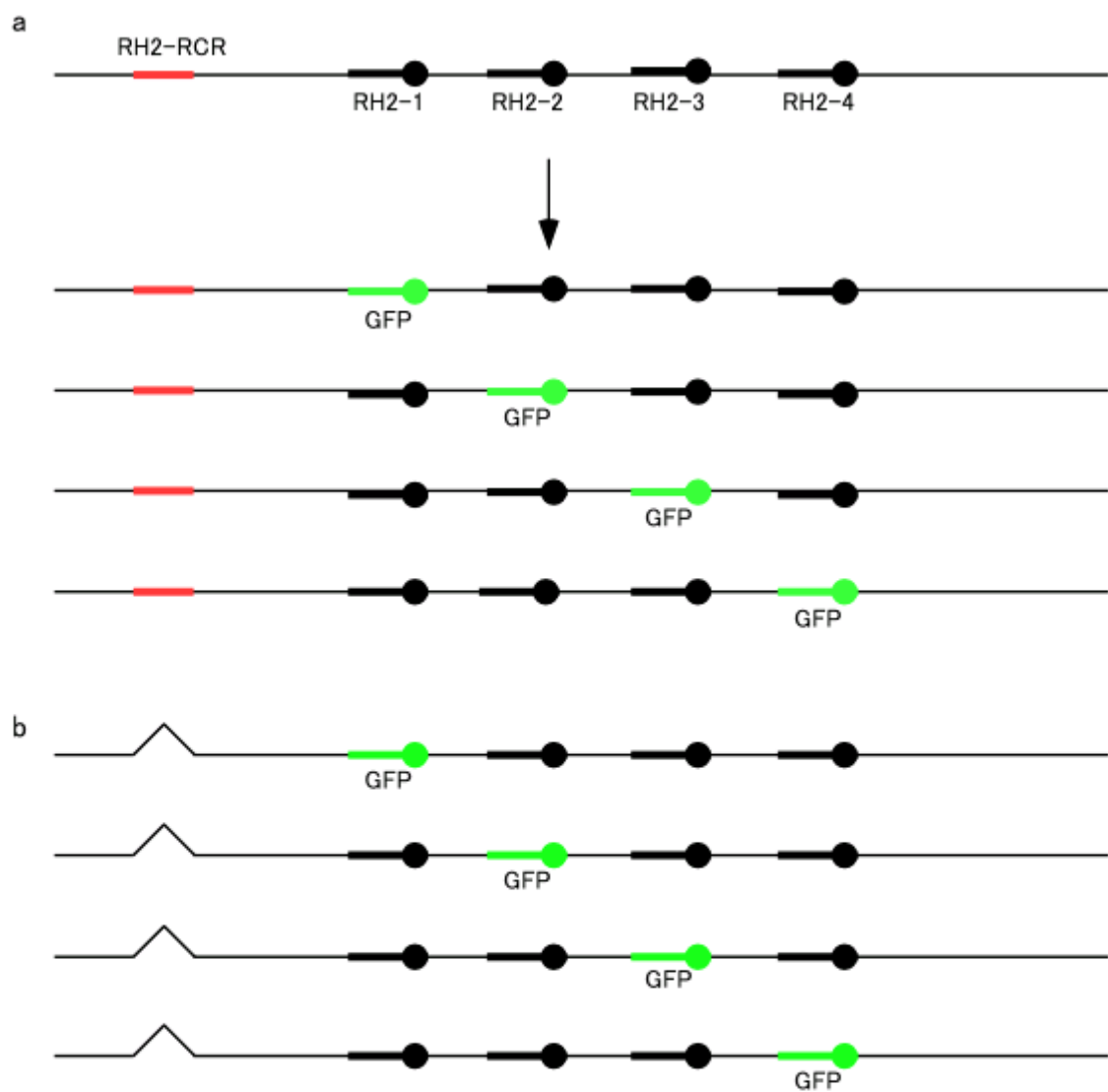


Fig.10

RH2 PACクローン改変コンストラクト

(a)RH2 PACクローンのRH2各遺伝子をGFP遺伝子に置換。(b)さらにRH2-RCRを欠失(FRTに置換)。

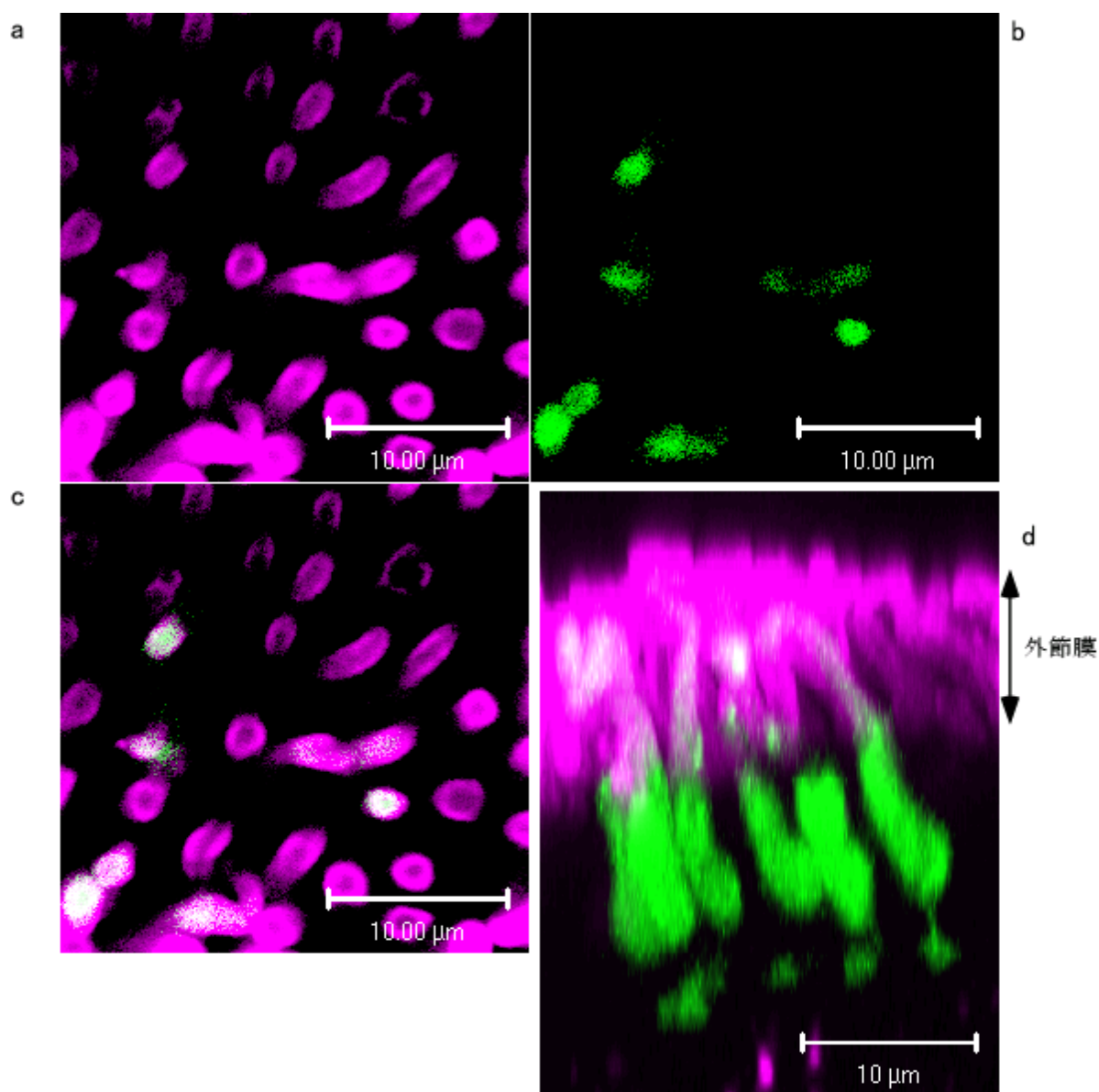


Fig. 11

RH2-1をGFPで置換したPAC DNAのトランジェントトランスジェニック個体眼球(7dpf) 抗RH2オプシン抗体による抗体染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(a)-(c)は網膜を平面から見た図。(a)抗RH2抗体のシグナル(マゼンタ)。(b)GFP蛍光(緑色)。(c)(a)と(b)の重ね合わせ画像。(d)は同じ領域の光学切片を重ね合わせて得た立体図。(a)-(c)を横から見ている。視細胞の外節膜の部分でマゼンタと緑のシグナルが重なっているのが分かる。

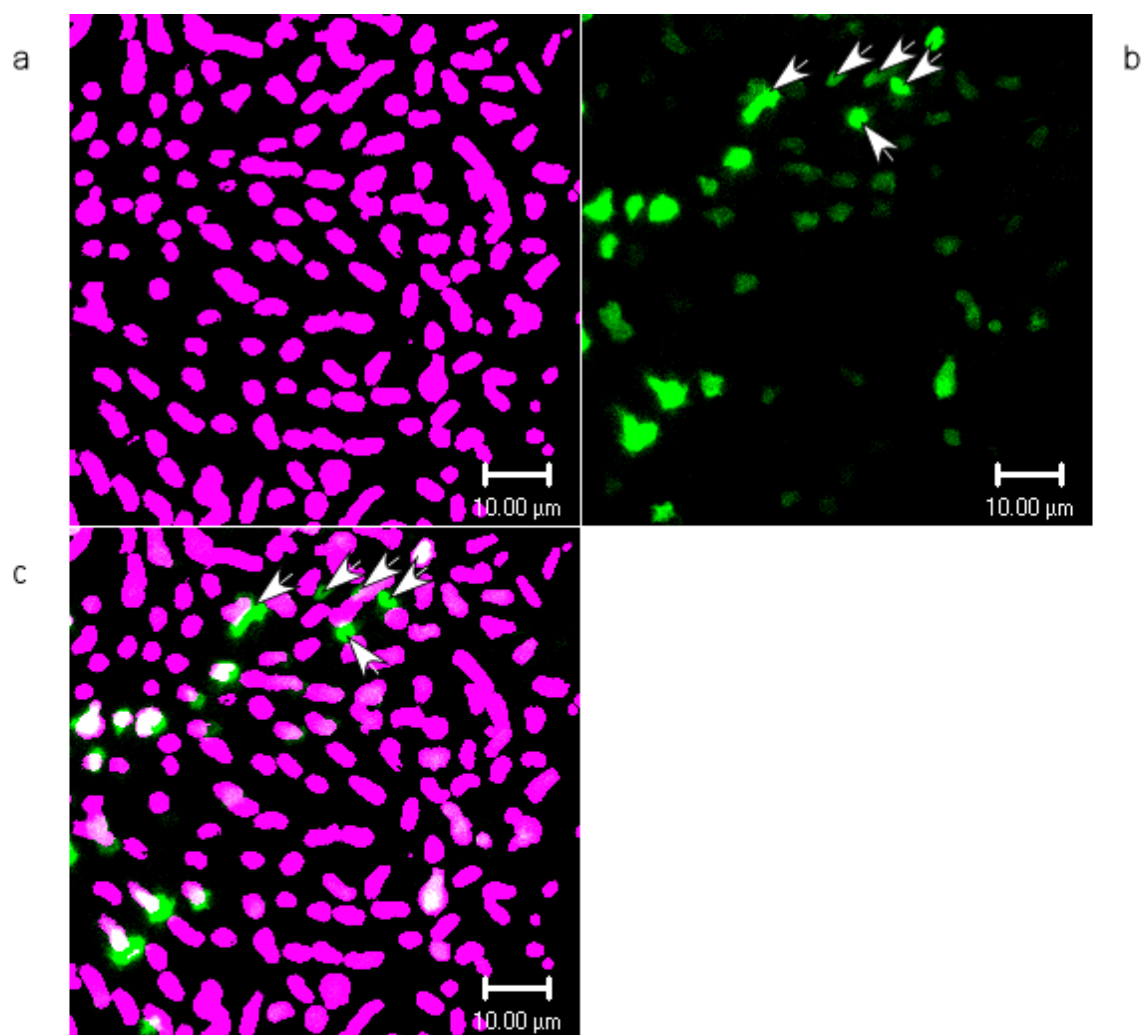


Fig. 12
 RH2-2をGFPで置換したPAC DNAのトランジェントトランスジェニック個体眼球(7dpf)。網膜の平面像。
 (a)抗RH2オプシン抗体による抗体染色(マゼンタ)。(b)GFP蛍光(緑色)。(c)(a)と(b)の重ね合わせ画像。
 GFPを発現している細胞の多くはSDCであるが、SDC以外の視細胞もGFPを発現している(矢印)。

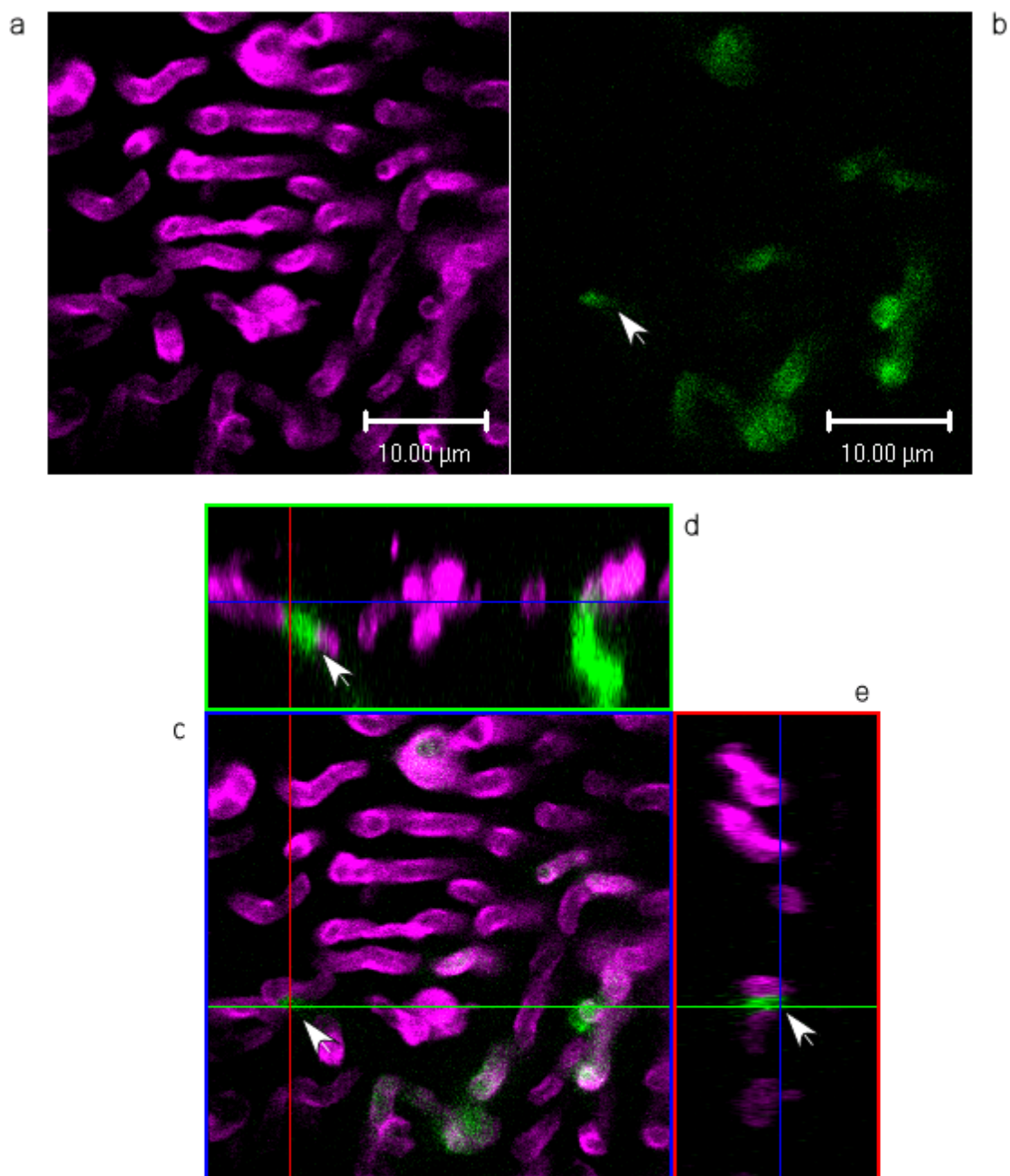


Fig. 13

RH2-3をGFPで置換したPAC DNAのトランジェントトランスジェニック個体眼球(7dpf)
 (a)抗RH2オプシン抗体による抗体染色(マゼンタ)。(b)GFP蛍光(緑色)。(c)(a)と(b)の重ね合わせ画像。(d)(c)の緑直線における断面図。(e)(c)の赤直線における断面図。(d)、(e)における青直線は(c)で示す断面の位置を表す。(b)-(e)の矢印は同一のシグナルを指している。この細胞はGFPを発現しているが、short members of double cone (SDC)ではないことが分かる。その他のGFPを発現している細胞はSDCであった。

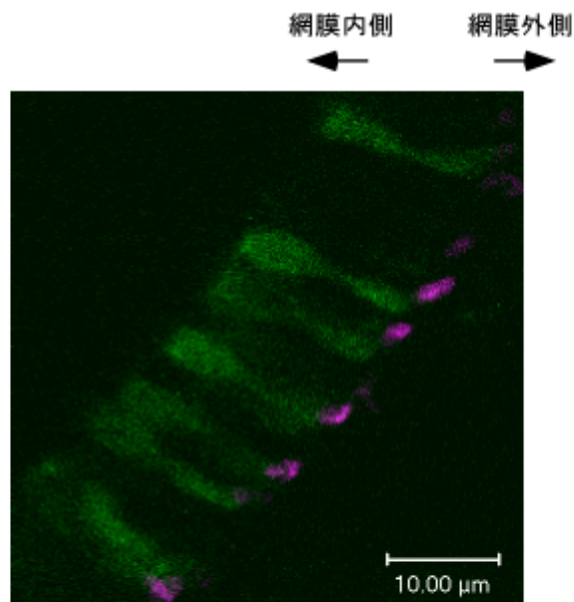


Fig. 14

RH2-4をGFPで置換したPAC DNAのトランジェントトランスジェニック個体(7dpf)
 緑はGFP蛍光、マゼンタは抗RH2オプシン抗体を用いた抗体染色のCy3蛍光。図は網膜の断面の図で、視細胞を横から見ている。網膜の周縁部においてのみGFP蛍光は観察された。GFPを発現している細胞はすべてshort members of double coneで、その外節膜において抗RH2オプシン抗体と重なっている。

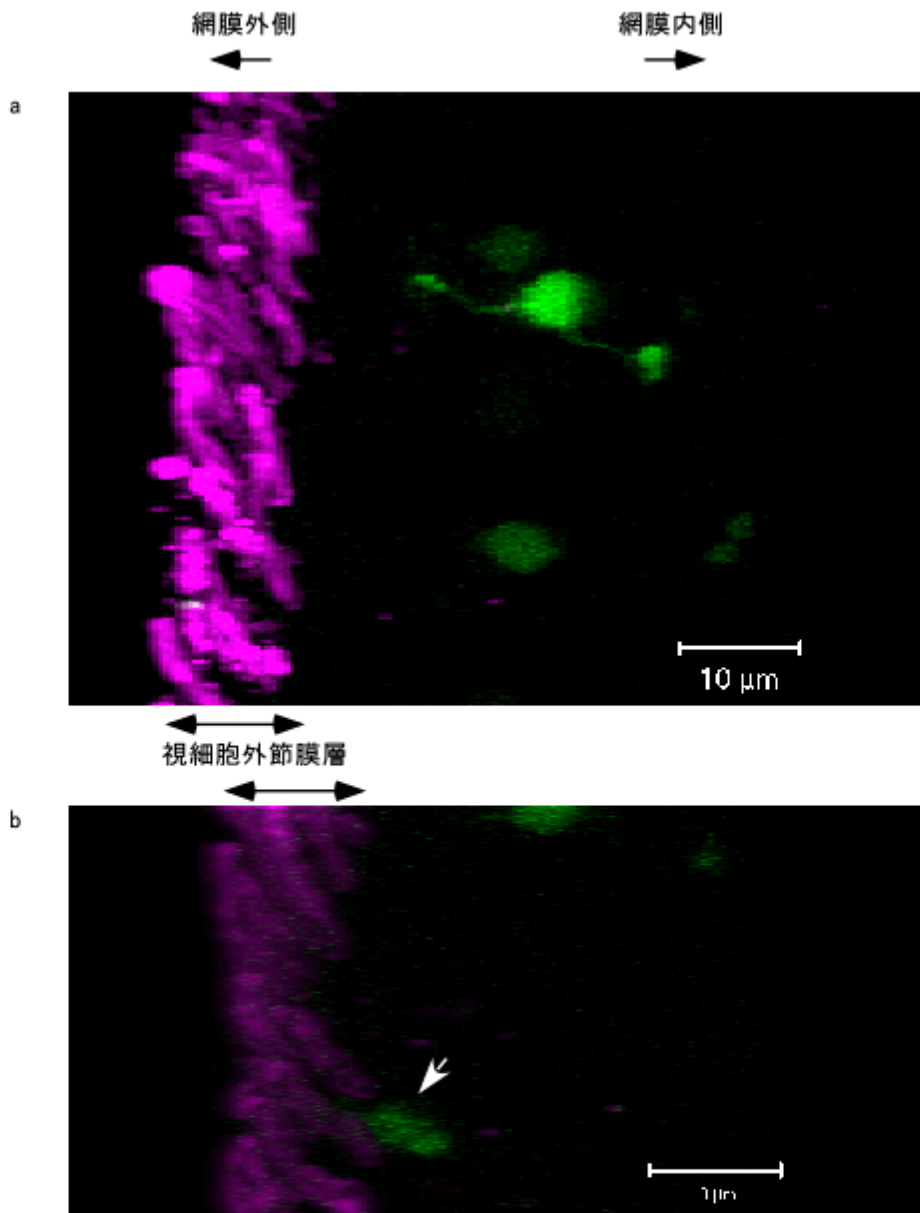


Fig. 15

RH2-RCRを欠失し、RH2-2をGFPで置換したPAC DNAのトランジェントトランスジェニック個体眼球でのGFPの発現。

マゼンタは抗RH2オプシン抗体のシグナル。緑色はGFP蛍光。(a),(b)とも網膜断面からの画像。(a) GFPは視細胞層より内側で発現している。形態的に双極細胞のような細胞で発現している。(b)(a)とは別の眼球。GFPは視細胞層にあるがSDCではない細胞で発現していた(矢印)。

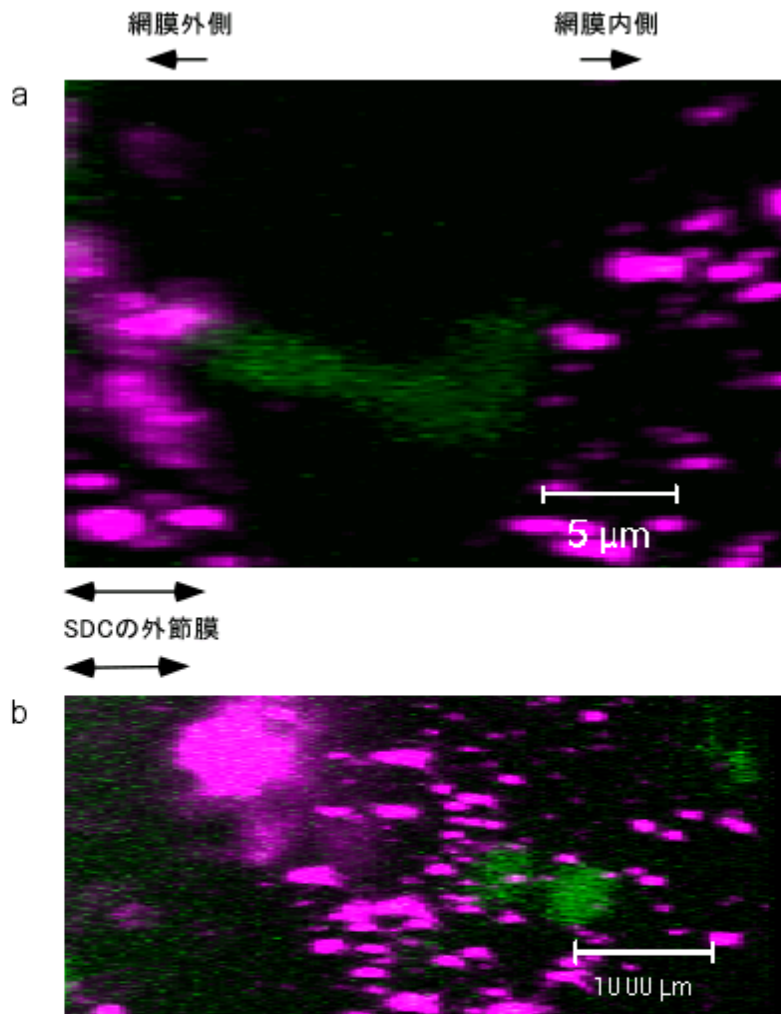


Fig. 16

RH2-RCRを欠失し、RH2-3をGFPで置換したPAC DNAのトランジェントトランスジェニック個体眼球でのGFPの発現。

(a)視細胞層にあるがSDCではない細胞でGFPが発現している。(b)視細胞層より内側にある双極細胞のような細胞でGFPが発現している。マゼンタは抗RH2オプシン抗体染色によるシグナル。緑色はGFP蛍光。

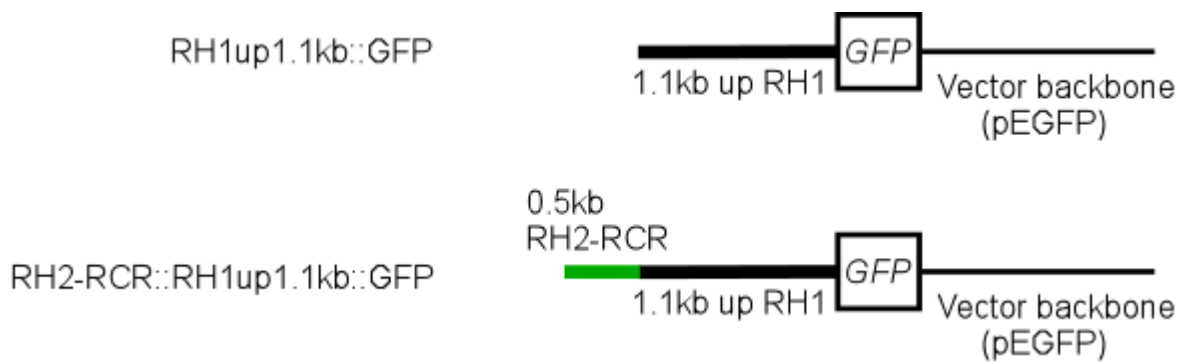


Fig. 17
 RH1上流1.1kbにGFPをつなげたコンストラクト(RH1up1.1kb::GFP)とそれにRH2-RCRを付加したコンストラクト(RH2-RCR::RH1up1.1kb)

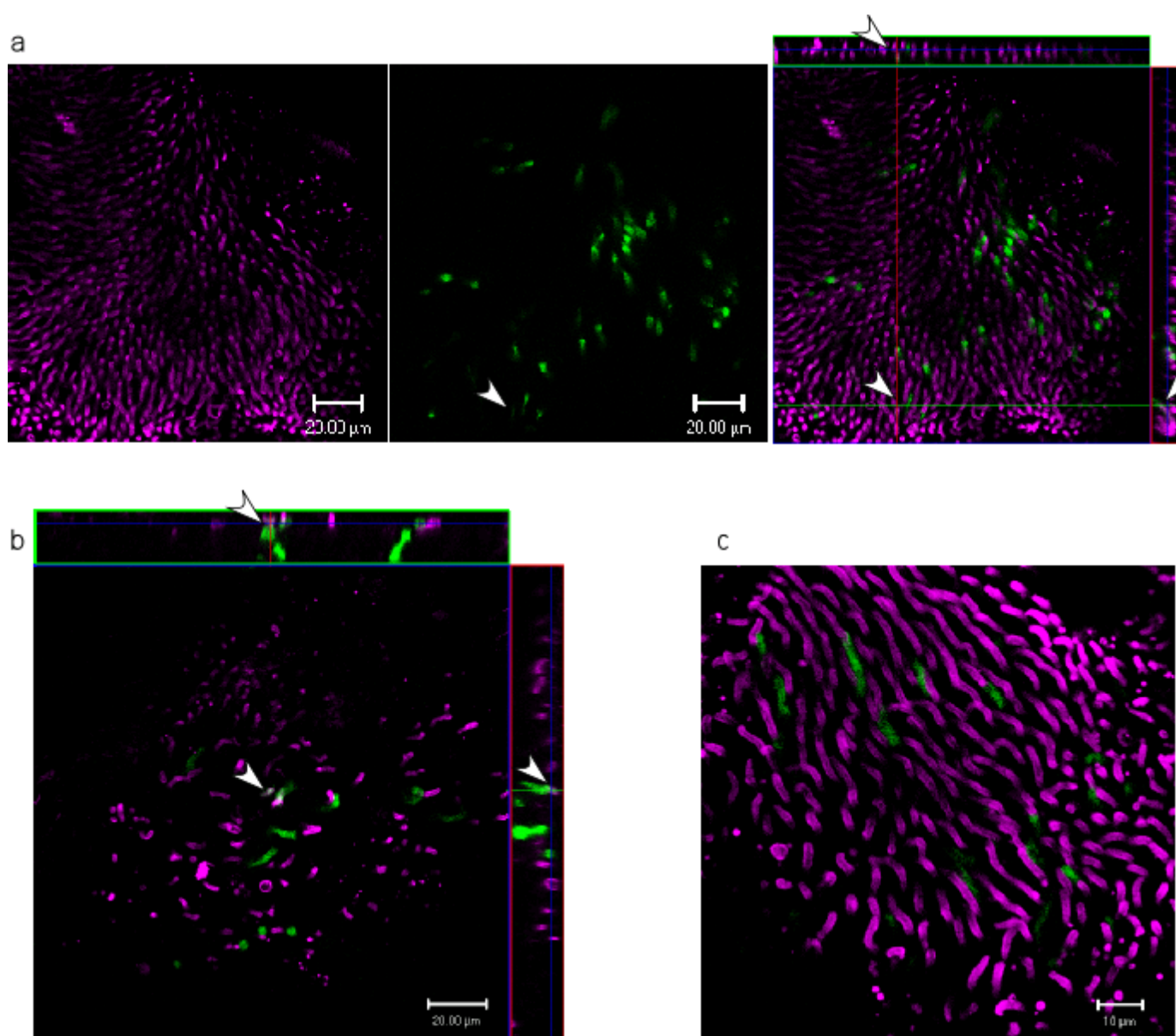


Fig. 18

RH1プロモーターにRH2-RCRを付加したコンストラクトのSDC発現誘導能。GFP(緑色)の発現する細胞がSDC(マゼンタ)であるかどうかを調べた。(a)RH2-RCR::RH1_{up}1.1kbをつないだGFPの発現。左はマゼンタのみ。中央はGFPのみ。右はその重ね合わせ。右と上にあるのはそれぞれ赤線および緑線における断面図。矢頭はGFPを発現しているSDCを指す。(b)RH2-RCR::RH1_{up}1.1kb::GFPをインジェクションした(b)とは別の個体の眼球。矢頭で示したのはGFPを発現しているSDC。(c)RH1プロモーターのみをつなげたGFPの発現。SDCで発現するGFPはない。

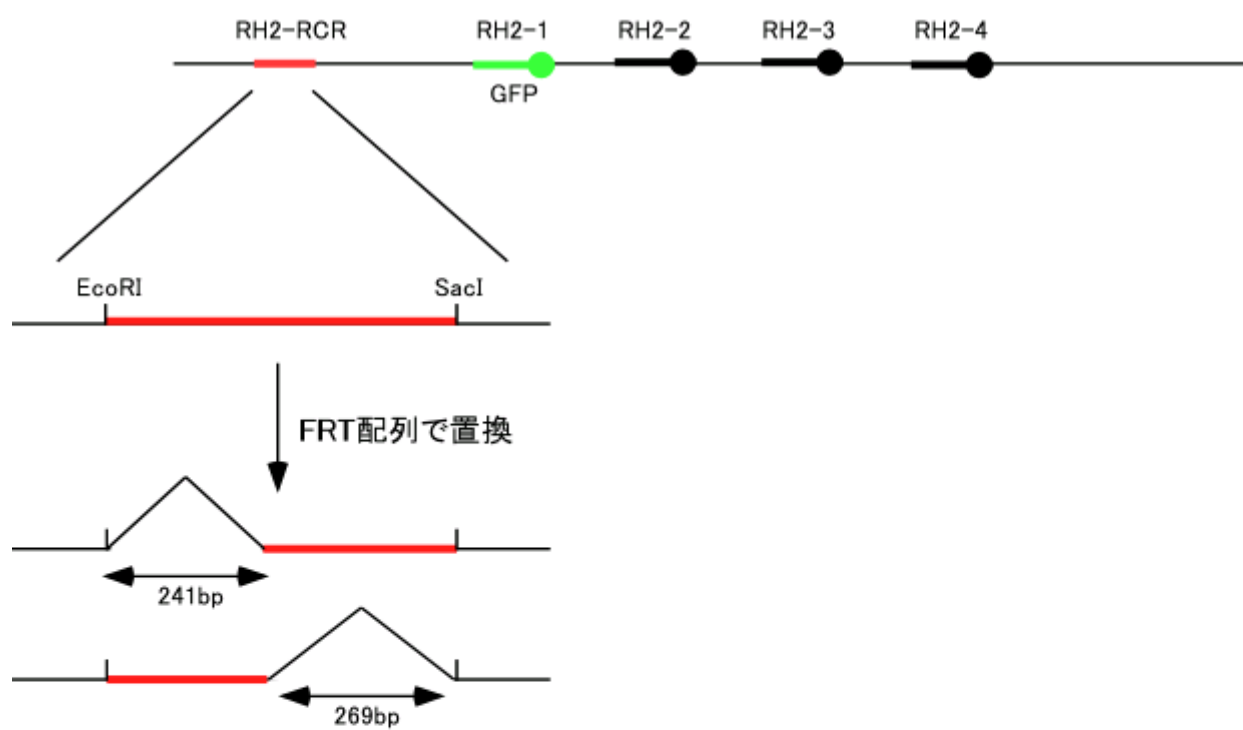


Fig. 19
 RH2-RCRを5'側と3'側の半分ずつに沸け、それぞれFRT配列で置換して欠失させた。
 GFPはRH2-1と置換した。

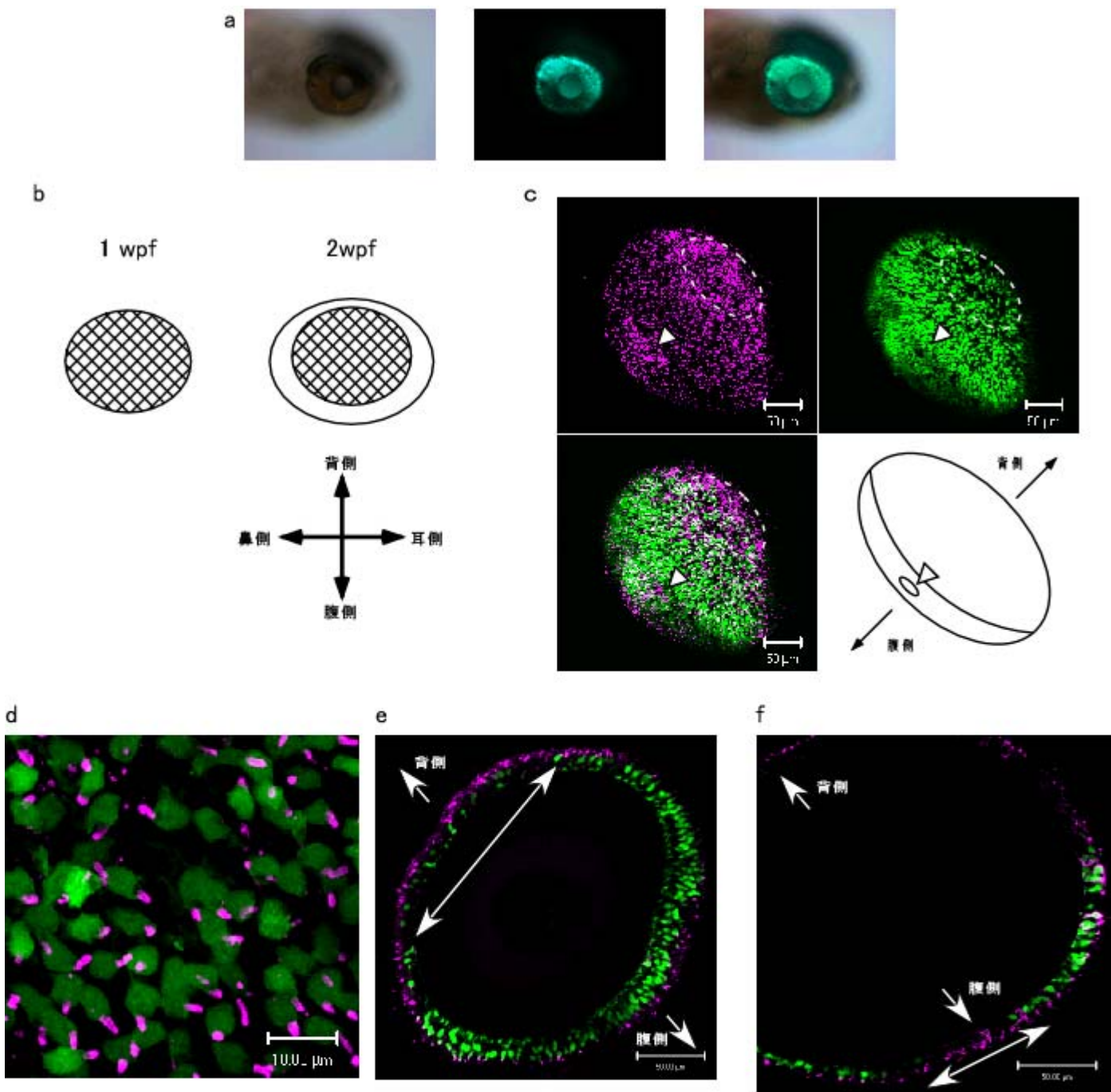


Fig. 20
RH2-1をGFPに組み換えたPAC DNAのトランスジェニックゼブラフィッシュF1
 (a)トランスジェニックゼブラフィッシュ(7dpf)頭部の透過光像(左)、GFP蛍光像(中央)、重ね合わせ(右)。眼球だけでGFPが発現している。(b)幼魚におけるRH2-1の発現パターン。網膜の網掛けの領域でRH2-1が発現していることを示す。1週間では網膜全体で発現しているが、2週間では網膜の周縁部では発現していない。(c)-(f)眼球を摘出し抗RH2オプシン抗体を用いて抗体染色。共焦点レーザー顕微鏡で観察。マゼンタはRH2オプシンのシグナル、緑色はGFPのシグナル、白色は両者の重ね合わせ。(c)-(e)は9dpf、(f)は2wpfの個体から摘出した眼球。(c)光学切片を重ね合わせて眼球全体を立体構成した画像。眼球のレンズの向きは右上方手前の向きにあたり、図は網膜を眼球の内側から見ている。矢頭で示したのが視神経の位置、眼球の背側腹側の方向は右下図の矢印で示した通り。左上はRH2オプシンのシグナル、右上はGFPのシグナル、左下はその重ね合わせ。白点線で囲んだ網膜背側の領域でshort members of double cone (SDC)であるのにGFPが発現していない細胞の割合が多くなっている。(d)同じ眼球で網膜の中央付近を外側正面から捉えた図。ほぼ全てのSDCがGFPを発現していることが分かる。(e)同じ眼球で網膜周縁部の断面を捉えた光学切片画像。両矢印で示した背側の領域でGFPの発現が疎らになっている。(f)2wpfの個体の眼球。周縁部の光学切片画像。背側に加えて腹側でもGFPの発現が疎らになってきたことが分かる。

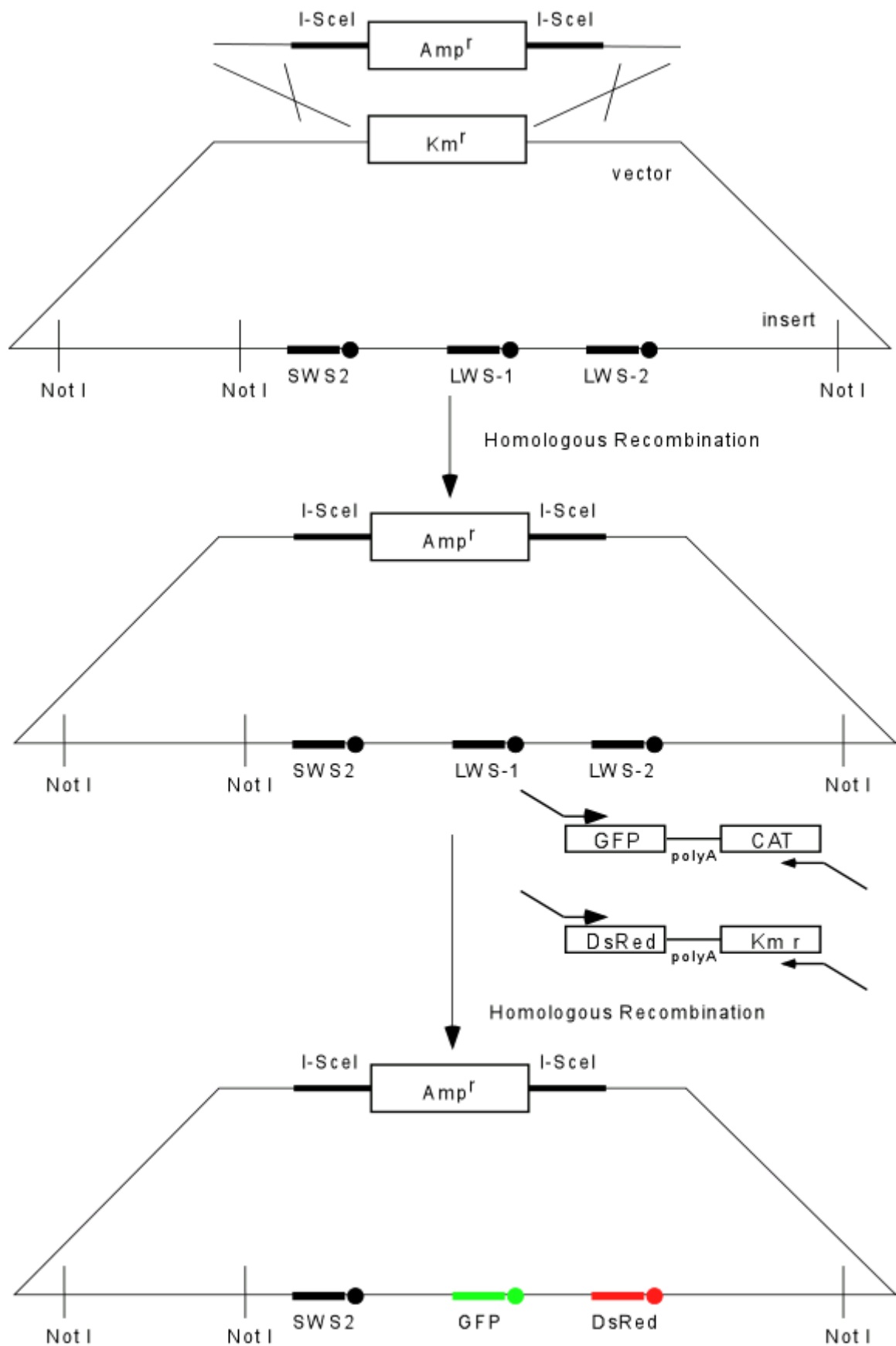


Fig. 21
LWS PAC DNA改変コンストラクトの作製

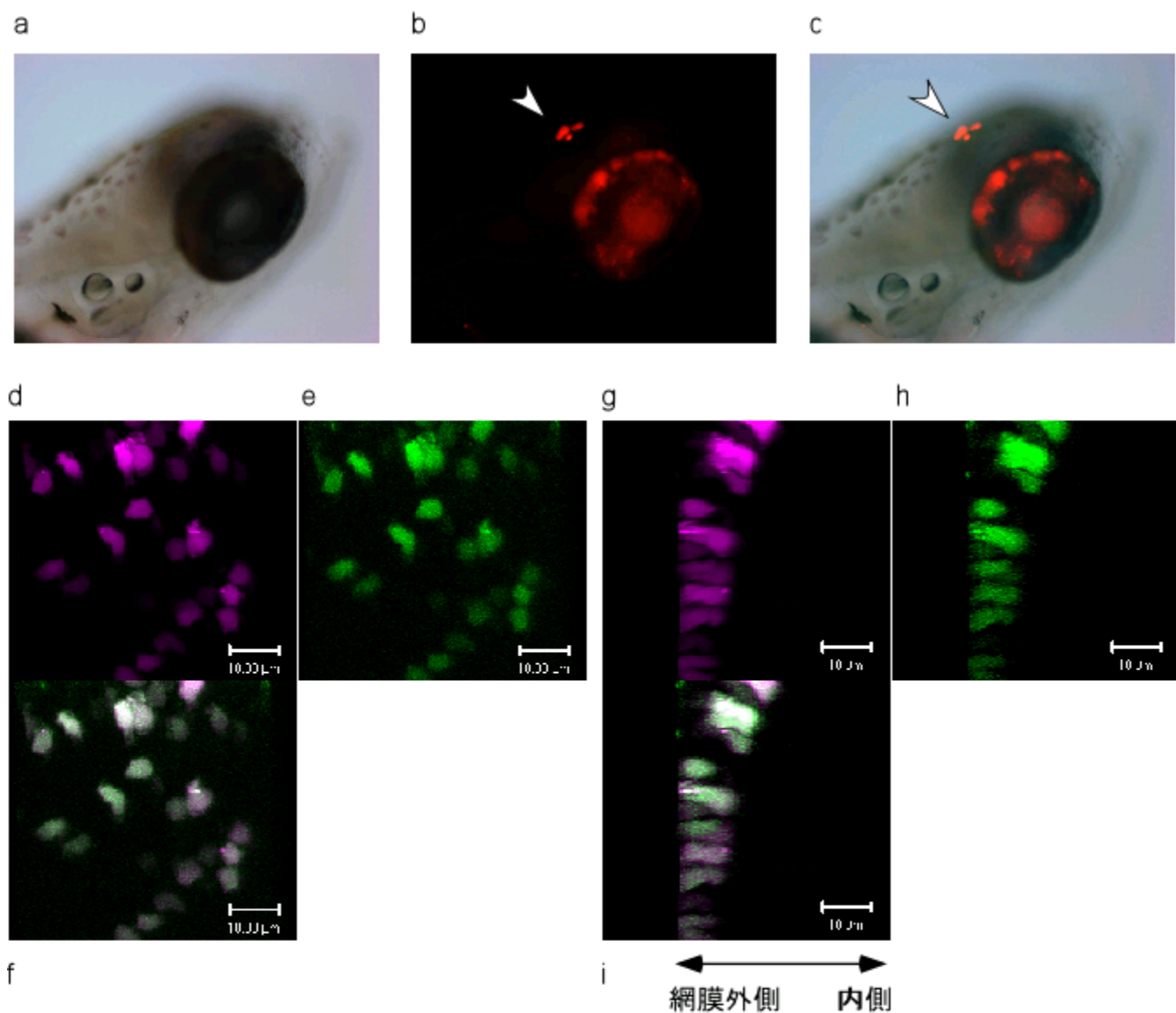


Fig. 22
 LWS PAC(E) の改変コンストラクトをゼブラフィッシュにマイクロインジェクション。9dpfで観察。
 (a)ゼブラフィッシュの頭部周辺の透過光像。(b)(a)と同じ場所におけるDsRed蛍光(赤色)。(c)(a)と(b)の重ね合わせ画像。矢頭は松果体におけるDsRedの発現。(d)~(i)眼球を摘出し共焦点レーザー顕微鏡で観察。(d)~(f)は網膜の中央領域を平面から撮影。(g)~(i)は(d)~(f)を横から見た図で網膜を断面から見ている。マゼンタはDsRed蛍光。緑色はGFP蛍光。白色はマゼンタと緑色の重ね合わせ。

8 . 付記

本文中に記載のない試薬の組成

ゲノム抽出用 Lysis バッファー

50 mM KCl

10 mM Tris-HCl (pH 8.3)

1.5 mM MgCl₂

0.1% Gelatin

0.45% Tween-20

0.45% NP-40 (Nonidet P-40)

125 μg/ml Proteinase K

1 × PBS

137mM NaCl

2.7mM KCl

10mM Na₂HPO₄

1.8mM KH₂PO₄

adjusted pH to 7.4