

ゼブラフィッシュ重複赤型視物質遺伝子における発現制御領域の探索

平成 17 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

46549 細谷知広

指導教官 河村正二

平成 18 年 1 月 31 日提出

目次

| | | |
|-------|---|----|
| I | 序論 | |
| I-1 | 背景 | 2 |
| I-2 | 本研究の目的 | 11 |
| II | 試料と方法 | |
| II-1 | 試料 | 12 |
| II-2 | 方法 | 13 |
| III | 結果 | |
| III-1 | GFP（または Venus）発現 PAC コンストラクトのマイクロインジェクション | 26 |
| III-2 | GFP 発現コンストラクトによる <i>LWS-2</i> の発現制御領域の探索 | 29 |
| III-3 | <i>LWS-1</i> 上流領域における <i>LWS-2</i> の発現制御領域の探索 | 31 |
| IV | 考察 | |
| IV-1 | PAC コンストラクトにおけるレポーター遺伝子の発現 | 33 |
| IV-2 | <i>LWS-2</i> の発現制御領域について | 34 |
| V | 謝辞 | 36 |
| VI | 引用論文 | 37 |
| VII | 図表 | 41 |
| VIII | 付記 | 55 |

I 序論

I-1 背景

私たちの生活している世界は、実に多彩な色で溢れている。このような多くの色を感じることができるのは、私たちが色を区別する色覚を備えているためである。色覚は異なる波長の光を色として認識する感覚であり、明暗の違いを認識する光覚とともに視覚を構成している。色覚によってもたらされる色はヒトの生活になくてはならないものであり、信号機の色や注意を促す標識には識別しやすい色彩が採用されているなど、ヒトは自らの形成した社会の中で巧みに色を利用している。そして、ヒトはそれらの色の利用を単なる情報伝達の領域にとどめることなく、ファッションや芸術といった自己表現の手段にまで発達させた。高度な社会と文化をもつヒトに限らず、動物は自らが生息する特定の光環境下で、食物を採取する時や配偶者の選択をする時、また、自然現象や捕食者などの危険を回避する時などに色覚情報を重要な判断材料としており、色覚は動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。

脊椎動物における視覚は、網膜の視細胞で光受容が行われることに起因し、それに続く神経伝達によって達成される。視細胞には薄暗い光環境下で明暗の識別を担う桿体細胞と、明るい光環境下で色覚を担う錐体細胞が存在する。視細胞には光受容分子である視物質が多量に存在しており、視細胞における光受容の主役を担っている。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（ビタミン A のアルデヒド）が結合した複合体である(Palczewski et al., 2000)。ある視物質が最も吸収する光波長を最大吸収波長 (λ_{max}) といい、その視物質の光吸収特性を示す値として用いられている。視物質の光吸収特性は、主にオプシンの一次構造すなわちアミノ酸配列の違いによって異なる。オプシンを産生する視物質遺伝子は、進化系統学的に 5 種類のグループに分類される。これ

らのグループに属する視物質遺伝子によって産生される視物質はグループごとにある範囲内の λ_{\max} を示す。5種類のグループは、桿体細胞で発現する桿体型視物質であるRH1（桿体型： $\lambda_{\max}=480\sim 510\text{ nm}$ ）と、錐体細胞で発現している4種の錐体視物質であるM/LWS（赤型： $\lambda_{\max}=510\sim 560\text{ nm}$ ）、RH2（緑型： $\lambda_{\max}=470\sim 510\text{ nm}$ ）、SWS1（紫外線型： $\lambda_{\max}=360\sim 430\text{ nm}$ ）、SWS2（青型： $\lambda_{\max}=440\sim 460\text{ nm}$ ）とで構成されている（Fig. 1.）（Yokoyama, 2000）。

色覚が成立するためには、少なくとも異なる光吸収特性をもつ錐体視物質を2種類以上持つことが必要である。一般的に魚類、爬虫類や鳥類は、M/LWS、RH2、SWS1、SWS2の4種類の錐体視物質をもち、4色型色覚と呼ばれている。一方、哺乳類は霊長類の一部が3色型色覚なのを除いて、M/LWSとSWS1をもつ2色型色覚である。このように多くの動物種において複数種の錐体視物質をもつことが知られているが、それらが異なる錐体細胞で発現しなければ色覚は成立しない。なぜなら、ある波長の光に対して異なる感受性をもつ複数種の錐体細胞が存在し、その感受性の差を脳で処理することで色覚が成立するためである。そのため、特定の視物質が特定の視細胞で特異的に発現する機構、すなわち、1視細胞1視物質遺伝子の発現制御機構は、色覚成立の根幹をなす重要な機構であり、その解明は大変興味深い。しかし、視物質遺伝子のレパートリー（Fig. 1.）に関する知見に比べ、その発現制御機構については、桿体視物質に関してはある程度まで研究が進んでいるものの、錐体視物質に関してはそのほとんどが明らかにされていない。

脊椎動物の中でも、高度な色覚を備えている動物群の一つに魚類が挙げられる。これは、水中の光環境が水深や濁度などの要因によって陸上よりも多様であり、それに適応して進化したためであると考えられている。また、魚類の色覚系には興味深い機構がある。各視物質遺伝子が遺伝子重複により生じた光吸収特性の異なるサブタイプを有することである（Chinen et al., 2003）。このような高度な色覚系を有することを示す知見に加え、上記のように魚類は一般に4グループ全ての錐体視物質遺伝子をもつために、脊椎動物の色覚系の

プロトタイプとしても捉えることができることから、魚類は色覚進化のよい研究材料であるといえる。硬骨魚類の1種であるゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は、多産で世代交代が早いこと、胚が透明で観察が容易なことから、発生遺伝学の分野において注目されているモデル動物である。また近年、GFP (green fluorescent protein) 発現ベクターを用いたトランスジェネシスの手法によって、遺伝子発現やタンパク質の局在や動態を生体内でリアルタイムにモニタリングすることが可能となっており、ゼブラフィッシュにおいてもこの手法が確立されている(Amsterdam et al., 1995; Higashijima et al., 1997)。このような実験手法上の利点や、先に述べたような色覚進化の研究材料としての利点から、ゼブラフィッシュを用いて視物質遺伝子の発現制御機構を解明することは大変有意義である。

ゼブラフィッシュの視細胞には、桿体細胞と4種類の形態の異なる錐体細胞 long single cone (LSC)、short single cone (SSC)、long members of double cone (LDC)、short members of double cone (SDC) がある (Fig. 2A.) (Branchek and Bremiller, 1984)。桿体細胞は RH1 (桿体型)、LSC は SWS2 (青型)、SSC は SWS1 (紫外線型)、LDC は M/LWS (赤型)、SDC は RH2 (緑型) を特異的に発現している(Raymond et al., 1993; Vihtelic et al., 1999)。さらにゼブラフィッシュを含む魚類の多くは、錐体細胞が網膜上でモザイク状に規則正しく配列しており (Fig. 2B.)、視細胞分化が厳密に制御されている。当研究室により、ゼブラフィッシュの全視物質遺伝子のレパートリーが明らかにされており、M/LWS (赤型視物質遺伝子) には *LWS-1* と *LWS-2* の2種類のサブタイプが、RH2 (緑型視物質遺伝子) には *RH2-1~4* の4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. 3.) (Chinen et al., 2003)。またこれら全てが成魚の網膜で発現しており、各視物質の λ_{max} と発現量が大きく異なっていた (Fig. 4.) (Chinen et al., 2003)。さらに、*in situ* hybridization 法により、それらの網膜における発現パターンがサブタイプ間で時間的空間的に明確に異なることが明らかにされている(Takechi and Kawamura, 2005)。空間的な発現パターンをみると、LWS 遺伝子群は、*LWS-2* が網膜の中央から背側にかけて発現し、*LWS-1* が

網膜の周縁部、特に腹側の領域に発現している (Fig. 5A.)。また、RH2 遺伝子群は、*RH2-1* と *RH2-2* が網膜の中央から背側にかけて発現し、*RH2-3* と *RH2-4* は網膜の周縁部、特に腹側の領域に発現している (Fig. 5B.)。LWS 遺伝子群と RH2 遺伝子群の両方において、 λ_{\max} を長波長側にもつサブタイプが腹側で主に発現しており、短波長側のものが中央部から背側にかけて発現するという興味深い傾向がある。成長時期によって眼で捉えるべき対象の種類と空間的な位置は異なり、生息する水深によっても光環境は変化すると考えられる。よって、LWS 遺伝子群と RH2 遺伝子群にみられるこのようなサブタイプ間での機能分化は、魚類の生態と密接に関わりながら進化して獲得されてきたと考えられる。そして、この機能分化の形成過程で、視物質遺伝子のサブタイプ間での発現制御機構は重要な役割を果たしており、その解明は大変に興味深いものである。そこで、私はゼブラフィッシュ赤型視物質遺伝子 (*LWS-1*, *LWS-2*) 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赤型視物質遺伝子のサブタイプは 2 種類であり、4 種類のサブタイプをもつ緑型視物質遺伝子よりもサブタイプ間での発現制御機構が比較的単純であると推測される。そのため、赤型視物質遺伝子のサブタイプ間での発現制御機構を解明することは、色覚成立に必須な 1 視細胞 1 視物質遺伝子の発現制御機構の解明につながるだけでなく、サブタイプ間での発現制御機構の基本モデルとなることが期待される。以下に視物質遺伝子の発現制御機構に関するこれまでの知見を示す。

桿体視物質遺伝子の発現制御機構についてはいくつかの生物種で解析が行われており、視物質遺伝子の中で最もその発現制御機構が調べられている。哺乳類では *RH1* 上流領域に存在する多くのシス調節エレメントや転写調節因子 (トランス調節エレメント) が同定されている。シス調節エレメントとしては、Ret-1/PCE-1、BAT1/OTX、NRE、Ret-4 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は、CRX (Chen et al., 1997; Furukawa et al., 1997)、NRL (Swaroop et al., 1992; Rehemtulla et al., 1996)、QRX (Wang

et al., 2004)、NR2E3 (Cheng et al., 2004)が同定されている。BAT/OTX と Ret-4 の各シス調節エレメントには、ホメオドメインをもつ転写調節因子である CRX が結合することが知られている。CRX は桿体細胞だけでなく錐体細胞でも発現しており、網膜での視細胞分化を誘導する重要な転写調節因子として注目されている(Furukawa et al., 1999)。また、NRE にはロイシンジッパー型の転写調節因子である NRL が特異的に結合することが知られている。この NRL は桿体細胞に特異的に発現する転写調節因子であり、CRX と協調的に *RHI* の発現を誘導していると考えられている(Mitton et al., 2000)。NRL は哺乳類だけでなくアフリカツメガエルでも同定されており、NRE が多くの生物種で保存されていることから、桿体視物質遺伝子の発現制御機構は非常に保存的であると考えられている(Whitaker and Knox, 2004)。上流領域における発現制御領域の探索では、アフリカツメガエルやゼブラフィッシュにおいて、桿体視物質遺伝子上流領域を連結したレポーター遺伝子を導入し、それらが桿体細胞で特異的に発現することが確認されている(Kennedy et al., 2001; Mani et al., 2001; Hamaoka et al., 2002)。

錐体視物質遺伝子の発現制御機構については、先にも述べたように、桿体視物質遺伝子に比べて研究が遅れており、現在までに異なる生物種で特定の視物質遺伝子の発現制御機構に関する知見が散在的に得られているのみである。桿体視物質遺伝子の発現制御機構において同定されているようなシス調節エレメントや転写調節因子に関する知見は乏しく、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)。上流領域における発現制御領域の探索では、いくつかの遺伝子においてトランスジェネシスの手法によって研究が行われている。現在までに、ヒトの SWS1 遺伝子(Chen et al., 1994)と M/LWS 遺伝子(Wang et al., 1999)、アフリカツメガエルの LWS 遺伝子(Moritz et al., 2002)、ゼブラフィッシュの SWS1 遺伝子(Takechi et al., 2003; Luo et al., 2004)において、その上流領域がそれぞれの錐体細胞での特異的な発現を誘導できることが明らかになっている。中でも本研究で対象としているゼブラフィッシュ

に関しては特によく解析されており、ゼブラフィッシュの *SWS1* では、上流約 4.5 kb に存在する領域と上流 450 bp から 100 bp の領域がその発現に必要であることが示されている (Luo et al., 2004)。

ゼブラフィッシュの RH2 遺伝子については、当研究室で行われたトランスジェネシスの手法を用いた研究によりいくつかの知見が得られている (知念秋人 博士学位論文、辻村太郎 修士論文)。はじめに、*RH2-1~4* の各遺伝子上流領域を GFP 遺伝子に連結した GFP 発現コンストラクトを作製し、これらをゼブラフィッシュの受精卵に導入した実験によって、各遺伝子上流領域に発現制御領域が存在するのかが調べられた。その結果、RH2 遺伝子が本来発現すべき SDC において GFP の発現が確認されたのは *RH2-3* の上流 2.6 kb を用いた場合のみであった。しかし、この *RH2-3* の上流 2.6 kb を用いた GFP 発現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、さらに詳細に解析したところ、GFP を発現している SDC は網膜の中央付近に存在しており、*RH2-3* は網膜の周縁部で発現するとする *in situ* hybridization の結果 (Fig. 5B) とは異なっていた。次に、*RH2-1* の上流 1.5 kb に GFP 遺伝子を連結した GFP 発現コンストラクトと、全ての 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、直上領域以外の発現制御領域の存在が調べられた。その結果、*RH2-1* の上流 15 kb に存在する 0.5 kb の領域と co-injection した場合においてのみ GFP の発現が誘導された。そこでこの領域は Remote Control Region (RH2-RCR) と命名され、さらに解析が進められることになった。RH2-RCR の co-injection 結果をもとにして、はじめの実験で使用した *RH2-1~4* それぞれの上流領域に GFP 遺伝子に連結したコンストラクトの上流側に RH2-RCR を付加してゼブラフィッシュに導入し、その GFP 発現が調べられた。その結果、*RH2-1* の上流 1.5 kb に RH2-RCR を付加したコンストラクトと *RH2-2* の上流 3.0 kb に RH2-RCR を付加したコンストラクトで SDC での GFP 発現が確認された。しかし、*RH2-3* の上流 2.6 kb に RH2-RCR を付加したコンストラクトと *RH2-4* の上流 2.6 kb に RH2-RCR を付加したコン

ストラクトでは、RH2-RCR を付加していない場合と同じ結果になり、RH2-RCR の効果は観察されなかった。これらの結果から、RH2-RCR は *RH2-1* と *RH2-2* の発現制御に関わっていることが示された。さらに RH2-RCR の機能解析を進めるために、*RH2-1~4* 全ての遺伝子においてその発現が SDC で再現できる GFP 発現コンストラクトを作製し、それらコンストラクトから RH2-RCR を欠失させた場合と比較することにより、RH2-RCR の *RH2-1~4* 全ての遺伝子における発現制御能を調べる実験が計画された。まず、全ての RH2 遺伝子を含む 85 kb の PAC クローン中の *RH2-1~4* をそれぞれ GFP 遺伝子に置換したコンストラクトが作製され、それをゼブラフィッシュに導入して GFP 発現が調べられた。その結果、*RH2-1~4* の全てのコンストラクトにおいて SDC での GFP 発現が確認され、PAC クローン中に *RH2-1~4* の全て遺伝子の SDC 特異的な発現制御領域が含まれていることが示された。次に、PAC クローンから RH2-RCR を欠失させた後に、上記のように *RH2-1~4* をそれぞれ GFP 遺伝子に置換したコンストラクトが作製され、それをゼブラフィッシュに導入して GFP 発現が調べられた。その結果、*RH2-1* と *RH2-4* のコンストラクトでは GFP 発現がみられず、*RH2-2* と *RH2-3* のコンストラクトでは RH2-RCR を欠失させていないときに比べて弱い GFP 発現が SDC 以外の細胞で確認された。以上のことから、RH2-RCR は *RH2-1~4* の全ての発現に必要な領域であることが示された。また、RH2-RCR が SDC 特異的な発現誘導能を有するののかも調べられている。ゼブラフィッシュの紫外線型視物質 SWS1 遺伝子の開始コドンから上流 205 b から 110 b の領域を、桿体型視物質 RH1 遺伝子のプロモーター領域に挿入すると、そのプロモーター領域に SSC（紫外線型錐体細胞）特異性を与えられることが示されている。これと同様に、RH2-RCR に SDC（緑型錐体細胞）特異的な発現誘導能があれば、*RH1* のプロモーター領域に連結することでエクソピックな SDC 発現誘導能を *RH1* に与えることが期待される。*RH1* の直上 1.1 kb のプロモーター領域は桿体細胞特異的な発現を誘導することが知られているため、この配列に GFP 遺伝子を連結したコンストラクトの上流側に RH2-RCR を付加し、これをゼブラフィッシュ

ユの受精卵に導入して GFP 発現を調べた。その結果、SDC での GFP 発現が確認され、RH2-RCR に SDC 特異性を規定する領域があることが示唆された。以上のように、ゼブラフィッシュの RH2 遺伝子については、*RH2-1*の上流 15 kb に存在する 0.5 kb の領域である RH2-RCR が *RH2-1~4*の全ての発現に必要な領域であることや SDC 特異性を規定する領域を含むことが示されている。

本研究の研究対象である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の結果と Luo らの報告(Luo et al., 2004) (これは *LWS-1*についてのみの報告)により、上流領域だけでは発現誘導を行えないことが分かっていた。そこで、当研究室では上記の RH2 遺伝子の場合と同様に、*LWS-1*と *LWS-2*の両方を含む長インサートの PAC クローン (Fig. 6.) を用いて、各 LWS 遺伝子をレポーター遺伝子に置換して、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検証された (辻村太郎 修士学位論文)。当研究室で行われた *in situ* hybridization 法による実験により、*LWS-1*は網膜の周縁部、特に腹側の領域に発現しており、*LWS-2*は網膜の中央から背側にかけて発現していることが明らかになっている(Takechi and Kawamura, 2005) (Fig. 5A.)。このような視物質遺伝子のサブタイプ間での空間的な発現制御の相違を解析するためにも、同一の PAC クローン中で *LWS-1*は GFP 遺伝子に、*LWS-2*は DsRed 遺伝子に置換された。この GFP・DsRed 発現 PAC コンストラクトをゼブラフィッシュの受精卵に導入したところ、GFP の発現は非常に弱いものの、網膜および松果体で GFP と DsRed の発現がみられた。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 の発現が網膜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。網膜における GFP と DsRed の発現を共焦点レーザー顕微鏡で詳細に観察したところ、GFP を発現している細胞と DsRed を発現している細胞は同一の細胞であった。その細胞は網膜中の位置とその形態から視細胞であると推測されたが、その細胞の種類を特定するには至っていない。次に、

in situ hybridization 法による実験で明らかにされた *LWS-1* と *LWS-2* の網膜での発現領域の違いを GFP と DsRed の発現が再現しているのかが観察された。その結果、GFP と DsRed の両方において網膜の周縁部と中央部とで発現に差は認められなかった。しかし、先にも述べたように、この GFP・DsRed 発現 PAC コンストラクトを用いた実験では、GFP の発現が非常に弱いという問題があった。GFP の発現は共焦点レーザー顕微鏡の感度を上げることで検出できる程度であり、DsRed の蛍光を GFP 検出用のフィルターが検出している可能性もある。それを確認するためには、PAC クローン中の *LWS-1* と *LWS-2* をそれぞれ単独で GFP 遺伝子や DsRed 遺伝子に置換する必要がある。

I-2 本研究の目的

以上のことから、私はゼブラフィッシュ赤型視物質遺伝子 (*LWS-1*, *LWS-2*) 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。

ゼブラフィッシュ重複赤型視物質遺伝子 (*LWS-1*, *LWS-2*) の発現制御機構を解明することにより、色覚の成立に必須な 1 視細胞 1 視物質遺伝子の発現制御機構を解明するとともに、重複遺伝子間における発現制御機構に関する新たな知見を得る。

これまでの知見をもとに具体的には以下の計画で研究を進めることにした。

ゼブラフィッシュ赤型視物質遺伝子 (*LWS-1*, *LWS-2*) の発現制御領域を、レポーター遺伝子発現コンストラクトを用いたトランスジェネシスの手法によって探索する。*LWS* 遺伝子に関しては、*LWS-1*と *LWS-2*の両方を含む長インサートの PAC クローンを改変して、*LWS-1* を GFP 遺伝子に、*LWS-2* を DsRed 遺伝子に置換したコンストラクトにより、それらが網膜および松果体で発現することが示されているが、GFP 発現が非常に弱いという問題があった。そこで、PAC クローン中の *LWS-1* と *LWS-2* をそれぞれ単独で GFP 遺伝子に置換したコンストラクトを作製し、その GFP 発現を確認することで PAC クローンに *LWS-1* と *LWS-2* の両方の発現制御領域が含まれているかを検証する。PAC クローンに各 *LWS* 遺伝子の発現制御領域が十分に含まれていると確認できた場合には、PAC クローンから領域を絞ったコンストラクトを作成し、*LWS-1* と *LWS-2* それぞれの発現制御領域の探索を行う。また、GFP 発現が網膜において確認された場合は、GFP 発現細胞が、*LWS* 遺伝子が本来発現する細胞である LDC であるかを確認する。

II 試料と方法

II-1 試料

本研究に使用したゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は WIK 系統である。ゼブラフィッシュは水温 28℃、 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飼料 (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 (初期飼料協和 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全て受精後から 12 から 24 時間後にメラニン形成阻害剤である 1-pheny-2-tiourea (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。

II-2 方法

II-2-1 相同組換えを用いた GFP（または Venus）発現 PAC コンストラクトの作製

II-2-1-A ゼブラフィッシュの各 LWS 遺伝子を含む PAC クローン

ゼブラフィッシュの各 LWS 遺伝子を含む PAC クローンは、ゼブラフィッシュの PAC ライブラリー (Library No. 706, originally created by C. Amemiya) のスクリーニングを German Resource Center for Genome Research (RZPD, Germany) (<http://www.rzpd.de/>) に委託して得られた。スクリーニングのプロープには *LWS-2* の全長 cDNA を使用した。これにより、*SWS2* と 2 つの LWS 遺伝子である *LWS-1* と *LWS-2* を含む PAC クローン BUSMP706E19271Q9 (以下 LWS PAC と約す) が得られた。この LWS PAC については、すでに当研究室においてインサートサイズの測定と、*Bam*H I、*Kpn* I、*Not* I による制限酵素地図の作成が行われており (Fig. 6.)、*SWS2* 上流約 15.5 kb から *LWS-2* 下流約 54 kb までの全長約 80 kb のインサートをもつ PAC クローンであることが分かっている (辻村太郎 修士論文)。また、この LWS PAC はベクター (pCYPAC6) に含まれるカナマイシン耐性遺伝子が、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アンピシリン耐性遺伝子に置換されている (辻村太郎 修士論文)。これはゼブラフィッシュの受精卵にこの PAC クローンを導入するとき、*I-Sce* I エンドヌクレアーゼとの co-injection を行うためである。メダカの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-Sce* I の認識サイトを付加した DNA を *I-Sce* I 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の樹立効率が向上するという報告があり (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からである (Grabher et al., 2004)。

II-2-1-B PAC クローンの相同組換えに用いたターゲッティング DNA 断片

相同組換えによって GFP（または Venus）発現 PAC コンストラクトを作製するために、EGFP 遺伝子もしくは Venus 遺伝子と相同組換えの選択マーカであるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子を含み、両端に 45 bp 程度の PAC クローンの配列に相同なターゲッティング配列を持つ DNA 断片を作製した。GFP 発現 PAC コンストラクトを作製するためのターゲッティング DNA 断片は、EGFP 遺伝子と CAT 遺伝子を連結した（GFP-CAT）カセットを有するプラスミドである pEGFP-CAT をテンプレートとして PCR を行って作製した（Fig. 7A.）。pEGFP-CAT は、pEGFP-1（Clontech）の EGFP 遺伝子と SV40 poly A シグナルの下流に位置する *Afl*II 認識サイトに、pBR328 から PCR によって増幅した CAT 遺伝子を挿入したものである。Venus 発現 PAC コンストラクトを作製するためのターゲッティング DNA 断片は、Venus 遺伝子と CAT 遺伝子を連結した（Venus-CAT）カセットを有するプラスミドである pVenus-CAT をテンプレートとして PCR を行って作製した（Fig. 7B.）。pVenus-CAT は、pEGFP-CAT の EGFP 遺伝子を *Bam*HI サイトと *Not*I サイトで切り出し、その部分に Venus/pCS2 から PCR によって増幅した Venus 遺伝子を挿入したものである。LWS PAC 中の *LWS-1* と *LWS-2* のエキソン 1 をそれぞれ独立に GFP-CAT カセットまたは Venus-CAT カセットに置換するのに用いるターゲッティング DNA 断片を作製するために、pEGFP-CAT または pVenus-CAT を *Bam*HI で直鎖状にしたものをテンプレートにして、それぞれ次ページのプライマーを用いて PCR を行った。

PAC LWS の相同組換えに用いたターゲッティング DNA 断片増幅用プライマーの一覧

LWS-1<>GFP-CAT-FOR は LWS-1 遺伝子のエキソン 1 を GFP-CAT カセットに置換するためのターゲッティング DNA 断片増幅用のプライマー、forward 側という意味である。-REV は reverse 側。以下同様とする。網掛けの部分はプライマーに付加した PAC クローンの配列に相同なターゲッティング配列である。なお、プライマーに含まれる EGFP 遺伝子と Venus 遺伝子の配列は同一であるため、GFP-CAT カセット置換に用いるターゲッティング DNA 断片増幅用のプライマーと Venus-CAT カセット置換に用いるターゲッティング DNA 断片増幅用のプライマーは同じものを使用した。

LWS-1<>GFP-CAT-FOR (LWS-1<>Venus-CAT-FOR)

5'-CAGCTAAGTGACTACAGGTTTGGGCTATACAACAAACCCCAAAAAATGGTGAGC
AAGGGCGAGGAG-3'

LWS-1<>GFP-CAT-REV (LWS-1<>Venus-CAT-REV)

5'-ATCAAATTACAAATATTTGTGTGAAAAAAGTTGAAAGACTCACCCAACTGGCCTC
AGGCATTTGAG-3'

LWS-2<>GFP-CAT-FOR (LWS-2<>Venus-CAT-FOR)

5'-AATGGAAATAATTCTTTTATTTATTTGATCTTCAGGGTTTCCAAAATGGTGAGCAA
GGGCGAGGAG-3'

LWS-2<>GFP-CAT-REV (LWS-2<>Venus-CAT-REV)

5'-ATGATTTATCCAGCTGTTCTGAAGATTAAGTTAGTATTTTACCCAACTGGCCTCA

GGCATTGAG-3'

PCR によって作製した各ターゲティング DNA 断片は、アガロースゲル電気泳動後に切り出して UltraClean 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories) を用いて 50~100 ng/ μ l の濃度に精製した。

II-2-1-C PAC クローンの相同組換え

LWS PAC 中の *LWS-1* と *LWS-2* のエキソン 1 をそれぞれ独立に GFP-CAT カセットまたは Venus-CAT カセットに置換するための相同組換えを行った (Fig. 8.)。相同組換えは、National Cancer Institute-Frederick の Dr. N. Copeland に供与していただいた大腸菌株 EL250 を用いて行った。EL250 は入ファージの *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、温度感受性入りプレッサー cI857 によりそれらの発現を制御することが可能である (Yu et al., 2000; Copeland et al., 2001; Lee et al., 2001)。実際の操作では、42°C のヒートインダクションで *gam* および *beta*、*exo* 遺伝子を発現させることができる。*gam* が大腸菌の *recBCD* を不活性化することにより、外来の直鎖状 DNA (今回の場合、ターゲティング DNA 断片) が安定に大腸菌内で維持される。そして、*beta* と *exo* により 40~50 bp という短い相同配列によって高い効率で相同組換えが起こる。温度感受性によって発現を制御できるため、*recBCD* の不活性化による大腸菌の生育への影響は一時的なものになり、また、*beta* と *exo* の発現も一時的なものとなるので大腸菌内の DNA は安定に維持される。さらに、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、1つの細胞当たり 1コピーのみが存在しており、厳密な温度感受性制御が達成される。

II-2-1-D PAC クローンの相同組換えの操作手順

まず始めに、LWS PAC を 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.) を使用し、抵抗 129 Ω 、電圧 2.45 kV、キュベット幅 2 mm の条件で行った。次に、それらの大腸菌を 32 $^{\circ}$ C で終日培養して、その培養液を 50 ml の LB 培地に 1% の濃度で植え継いだ。32 $^{\circ}$ C で 2.5 時間ほど培養して 600 nm の吸光度が 0.5 程度になったところで、50 ml の培養液を 25 ml ずつ 2 つに分けた。一方は 42 $^{\circ}$ C で 15 分間培養して gam、beta、exo のヒートインダクションを行った後、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 $^{\circ}$ C で 15 分間そのまま培養した後、氷水中で冷却した。これらの大腸菌をまず 3700 rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心して沈殿させ、上清を除去した後、30 ml の氷冷した滅菌水で洗浄した。その後、再び遠心して上清を除去して、今度は 1 ml の氷冷した滅菌水で洗浄した。洗浄後に上清を除去して、最終的に 200 μ l の滅菌水に懸濁した。この大腸菌懸濁液 50 μ l に対して、相同組換えにより LWS PAC 中の各 LWS 遺伝子と置換したいターゲッティング DNA 断片の溶液 (10~100 ng/ μ l) 3 μ l を加え、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 1 ml を加え、32 $^{\circ}$ C で 1~2 時間培養した。これを抗生物質 (アンピシリン 20 μ g/ml、クロラムフェニコール 10 μ g/ml) を含む LB プレートに広げ、32 $^{\circ}$ C で終日培養した。生育したコロニーは LB 培地に植え継ぎ、終日培養した後、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。以上のように相同組換えを行った LWS PAC は、*Bam*HI、*Kpn*I、*Not*I で制限酵素消化した後、アガロースゲル電気泳動によりバンドパターンを確認した。置換した GFP-CAT カセットまたは Venus-CAT カセットと PAC LWS との境界の塩基配列と、EGFP 遺伝子または Venus 遺伝子のコーディング塩基配列には実験操作による変異がないことを確認した。以下に今回相同組換えによって作製した 4 種類の GFP (または Venus) 発現 PAC コンストラクトを示

す (Fig. 9A.)。

相同組換えによって作製した GFP (または Venus) 発現 PAC コンストラクトの一覧

LWS-1<>GFP/LWS PAC は、LWS PAC 中の *LWS-1* のエキソン 1 を GFP-CAT カセットと置換したものを意味する。以下同様とする。

LWS-1<>GFP/LWS PAC

LWS-1<>Venus/LWS PAC

LWS-2<>GFP/LWS PAC

LWS-2<>Venus/LWS PAC

これらの GFP (または Venus) 発現 PAC コンストラクトは Plasmid Midi Kit (QIAGEN) により精製した。

II-2-2 *LWS-2* の発現制御領域の探索に用いた GFP 発現コンストラクトの作製

相同組換えによって LWS PAC 中の *LWS-2* のエキソン 1 を GFP-CAT に置換した PAC クローンである LWS-2<>GFP/LWS PAC をテンプレートとして、PCR によって様々な領域を含む GFP 発現コンストラクトを作製した。本研究で使用した *LWS-2* 発現制御領域探索用 GFP 発現コンストラクトとその作製手順を次ページ以降に示す (Fig. 10A.)。

LWS-2 発現制御領域探索用 GFP 発現コンストラクトの一覧

SWS2 5'up 5.2kb

SWS2 の上流 5.2 kb から *LWS-2* の終止コドンまでの GFP 発現コンストラクト。
LWS-2<>GFP/*LWS* PAC をテンプレートとして、*SWS2*の上流 5.2 kb の部位に設計したプライマー-SWS2 5'UP 5.2kb-FOR と *LWS-2* の終止コドンの直下に設計したプライマー *LWS-2* STOP CODON-REV を用いて PCR によって増幅した。

SWS2 5'UP 5.2kb-FOR

5'-CTGCAGTAATCTTGGTGATGGGAAATTTAA-3'

LWS-2 STOP CODON-REV

5'-GTTCAACAGGAGCTATAAATCACGTAAGAT-3'

LWS-1 5'up 2.6kb

SWS2 の終止コドンの直下から *LWS-2* の終止コドンまでの GFP 発現コンストラクト。
LWS-2<>GFP/*LWS* PAC をテンプレートとして、*SWS2*の終止コドンの直下に設計したプライマー-SWS2 STOP CODON-FOR と *LWS-2* STOP CODON-REV を用いて PCR によって増幅した。

SWS2 STOP CODON-FOR

5'-ACACAGTTCTCATGTAACCTCATCCTGCGGACGAA-3'

LWS-1 5'up 2.6kb ~ pA

SWS2 の終止コドンの直下から GFP-CAT カセット中の SV40 poly A シグナルまでの

GFP 発現コンストラクト。LWS-2<>GFP/LWS PAC をテンプレートとして、SWS2 STOP CODON-FOR と GFP-CAT カセット中の SV40 poly A シグナルの部位に設計した SV40polyA-REV を用いて PCR によって増幅した。

SV40polyA-REV

5'-TGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAAT-3'

LWS-1 5'up 1.9kb

LWS-1 の上流 1.9 kb から LWS-2 の終止コドンまでの GFP 発現コンストラクト。LWS-2<>GFP/LWS PAC をテンプレートとして、LWS-1 の上流 1.9 kb の部位に設計したプライマーLWS-1 5'UP 1.9kb-FOR と LWS-2 STOP CODON-REV を用いて PCR によって増幅した。

LWS-1 5'UP 1.9kb-FOR

5'-GAGAGAGAATGTGATGTTAGCTTTTGCCAT-3'

LWS-1 5'up 1.3kb

LWS-1 の上流 1.3 kb から LWS-2 の終止コドンまでの GFP 発現コンストラクト。LWS-2<>GFP/LWS PAC をテンプレートとして、LWS-1 の上流 1.3 kb の部位に設計したプライマーLWS-1 5'UP 1.3kb-FOR と LWS-2 STOP CODON-REV を用いて PCR によって増幅した。

LWS-1 5'UP 1.3kb-FOR

5'-TTGGTCTTGGCTCCATCCCCGTCCTGGTTT-3'

LWS-1 5'up 0.6kb

LWS-1 の上流 0.6 kb から *LWS-2* の終止コドンまでの GFP 発現コンストラクト。
LWS-2<>GFP/*LWS* PAC をテンプレートとして、*LWS-1* の上流 0.6 kb の部位に設計したプライマー *LWS-1* 5'UP 0.6kb-FOR と *LWS-2* STOP CODON-REV を用いて PCR によって増幅した。

LWS-1 5'UP 0.6kb-FOR

5'-AGCAAGTGCCATTATACAGAGAGTCTTAAA-3'

LWS-1 start codon

LWS-1 の開始コドンの直上から *LWS-2* の終止コドンまでの GFP 発現コンストラクト。
LWS-2<>GFP/*LWS* PAC をテンプレートとして、*LWS-1* の開始コドンの直上部位に設計したプライマー *LWS-1* START CODON-FOR と *LWS-2* STOP CODON-REV を用いて PCR によって増幅した。

LWS-1 START CODON-FOR

5'-AGGTTTGGGCTATACAACAAACCCCAAAAA-3'

LWS-2 5'up 1.8kb

LWS-1 の終止コドンの直下から *LWS-2* の終止コドンまでの GFP 発現コンストラクト。
LWS-2<>GFP/*LWS* PAC をテンプレートとして、*LWS-1* の終止コドンの直下に設計したプライマー *LWS-1* STOP CODON-FOR と *LWS-2* STOP CODON-REV を用いて PCR によって増幅した。

LWS-1 STOP CODON-FOR

5'-GTTGTGCACCAGATCTGAGTCAGACATGGGGAAAA-3'

PCRによって作製した以上の GFP 発現コンストラクトは、アガロースゲル電気泳動後に切り出して、UltraClean 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories) もしくは GENE CLEAN SPIN Kit (Q-BIO gene) を用いて 50~100 ng/ μ l の濃度に精製した。

II-2-3 co-injection に用いた *LWS-1* 上流領域 DNA 断片の作製

GFP 発現コンストラクトとの co-injection に用いた *LWS-1* 上流領域の DNA 断片は、LWS PAC をテンプレートとして PCR によって作製した。本研究で使用した *LWS-1* 上流領域 DNA 断片とその作製手順を以下に示す (Fig. 11A.)。

co-injection に用いた *LWS-1* 上流領域 DNA 断片の一覧

LWS-1 5'up 2.6 ~ 0kb

SWS2 の終止コドンの直下から *LWS-1* の開始コドン直上までの DNA 断片。LWS PAC をテンプレートとして、*SWS2* STOP CODON-FOR と *LWS-1* の開始コドンの直上部位に設計したプライマー LWS-1 START CODON-REV を用いて PCR によって増幅した。

LWS-1 START CODON-REV

5'-ATGCTCGGATCCTTTTTGGGGTTTGTGTATAG-3'

LWS-1 5'up 2.6 ~ 0.6kb

*SWS2*の終止コドンの直下から *LWS-1*の上流 0.6 kb までの DNA 断片。LWS PAC をテンプレートとして、SWS2 STOP CODON-FOR と *LWS-1*の上流 0.6 kb の部位に設計したプライマーLWS-1 5'UP 0.6kb-REV を用いて PCR によって増幅した。

LWS-1 5'UP 0.6kb-REV

5'-ATGGCAGGATCCGCTTACTGTAGGAGTAAATAA-3'

LWS-1 5'up 2.6 ~ 1.3kb

*SWS2*の終止コドンの直下から *LWS-1*の上流 1.3 kb までの DNA 断片。LWS PAC をテンプレートとして、SWS2 STOP CODON-FOR と *LWS-1*の上流 1.3 kb の部位に設計したプライマーLWS-1 5'UP 1.3kb-REV を用いて PCR によって増幅した。

LWS-1 5'UP 1.3kb-REV

5'-AGCCAAGGATCCGACAAAAGCAGTCTGTAAACTT-3'

LWS-1 5'up 1.9 ~ 0.6kb

*LWS-1*の上流 1.9 kb から 0.6 kb までの DNA 断片。LWS PAC をテンプレートとして、LWS-1 5'UP 1.9kb-FOR と LWS-1 5'UP 0.6kb-REV を用いて PCR によって増幅した。

LWS-1 5'up 1.9 ~ 1.3kb

*LWS-1*の上流 1.9 kb から 1.3 kb までの DNA 断片。LWS PAC をテンプレートとして、LWS-1 5'UP 1.9kb-FOR と LWS-1 5'UP 1.3kb-REV を用いて PCR によって増幅した。

LWS-1 5'up 1.3 ~ 0.6kb

LWS-1 の上流 1.3 kb から 0.6 kb までの DNA 断片。LWS PAC をテンプレートとして、LWS-1 5'UP 1.3kb-FOR と LWS-1 5'UP 0.6kb-REV を用いて PCR によって増幅した。

PCR によって作製した以上の *LWS-1* 上流領域 DNA 断片は、アガロースゲル電気泳動後に切り出して、UltraClean 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories) を用いて 50~100 ng/μl の濃度に精製した。

II-2-4 ゼブラフィッシュ受精卵への DNA コンストラクトのマイクロインジェクション

GFP (または Venus) 発現コンストラクトは、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 GD-1 (ナリシゲ) をプーラーで針状に加工したものを使用した。*I-SceI* 認識サイトをもつ GFP (または Venus) 発現 PAC コンストラクトは *I-Sce I* を添加して注入した (PAC クローン 20 ng/μl、0.5× *I-Sce I* バッファー (NEW ENGLAND BioLabs)、*I-Sce I* (NEW ENGLAND BioLabs) 0.5 U/μl、0.1% tetramethyl-rhodamine dextran (Molecular Probes))。それ以外の GFP 発現コンストラクトは KCl と tetramethyl-rhodamine dextran をそれぞれ終濃度 0.1 M、0.1% になるように添加して、DNA 濃度を 25-50 ng/μl に合わせて注入した。GFP 発現コンストラクトとの co-injection に用いた *LWS-1* 上流領域 DNA 断片は、GFP 発現コンストラクトと同じく DNA 濃度が 25-50 ng/μl になるようにして添加した。

II-2-5 幼生眼球に対する Whole-mount 抗体染色

受精後5-7日の幼生を固定液(4% paraformaldehyde/1×PBS)に室温で1時間浸した後、PBST (1% Tween-20/1×PBS) で5分間の洗浄を2回行った。この幼生の眼球を実体顕微鏡下で取り出すとともに眼球の周りの強膜を取り除き、PBSに終濃度 20 µg/mlになるように Proteinase K を添加した溶液に浸して、室温で5分間反応させた。これを固定液に室温で20分間浸した。PBSTで5分間の洗浄を2回行った後、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、抗赤型オプシン抗体をブロッキング溶液に50倍希釈した溶液に浸し、4℃で一晩反応させた(1次抗体反応)。反応後、PBSTで1時間の洗浄を3回行い、2次抗体 (anti-rabbit IgG-Cy3 conjugated (Sigma)) を抗体希釈液 (1% goat serum (Sigma) /PBST) に400倍希釈した溶液に眼球を浸し、室温で1時間反応させた(2次抗体反応)。反応後、PBSTで1時間の洗浄を3回行った。この眼球を30、50、70%グリセロール溶液中に5分間ずつ浸した後に、新しい70%グリセロール溶液に入れて4℃で保存した。

II-2-6 顕微鏡観察とイメージング

幼生眼球の蛍光観察には共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 (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) を使って画像を撮影した。

Ⅲ 結果

Ⅲ-1 GFP (または Venus) 発現 PAC コンストラクトのマイクロインジェクション

LWS PAC 中の *LWS-1* を GFP 遺伝子に置換した *LWS-1<>GFP/LWS* PAC と、*LWS-2* を GFP 遺伝子に置換した *LWS-2<>GFP/LWS* PAC を、1 細胞期のゼブラフィッシュの受精卵に *I-Sce I* と co-injection して、GFP 発現が網膜に見られるかを 7 dpf (days post fertilization) に観察した。その結果、*LWS-2<>GFP/LWS* PAC をマイクロインジェクションした個体では網膜および松果体で GFP の発現が確認された (Fig. 12)。しかし、*LWS-1<>GFP/LWS* PAC をマイクロインジェクションした個体では網膜に GFP の発現はなく、松果体のみに GFP 発現がみられる個体が低頻度で確認されたのみであった。また、*LWS-1<>GFP/LWS* PAC と *LWS-2<>GFP/LWS* PAC の両方において、個体によっては網膜と松果体以外に GFP 発現が確認された。これは、本研究で観察対象としたのが GFP 遺伝子がマイクロインジェクションによって導入された個体 (トランジェントトランスジェニック個体) であり、GFP 遺伝子を発生の初期から保持しているのではないことが原因であると考えられる。なぜなら、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決定されていくため、初期発生の段階途中で導入された外来遺伝子が本来の発現パターンを示さないことは十分に考えられるためである。ここで見られた GFP のエクトピックな発現も同様の原因によると考えた。そこで、以下は網膜と松果体における GFP 発現のみを観察の対象とした。また、トランジェントトランスジェニック個体においては、GFP 遺伝子はランダムに一部の細胞にしか取り込まれないので、マイクロインジェクションの結果を評価するにあたって、GFP 発現の定量化を行う必要性があった。そこで、Luo らにならい (Luo et al., 2004)、網膜での GFP 発現を 4 つのステージに分類して集計することにした。網膜に蛍光発現が見られない個体に関しては - としてカウントし

た。網膜に蛍光発現の見られる個体については、蛍光発現細胞の数によって+（蛍光発現細胞が1～10個）、++（蛍光発現細胞が11～50個）、+++（蛍光発現細胞が50個以上）と分類してカウントした。以下、これらの-、+、++、+++の個体の全観察個体に対する割合によってマイクロインジェクションの結果を評価することにした。

当研究室で行われた研究により、幼生期においては *LWS-1* の発現量が *LWS-2* よりも低いことが明らかにされている(Takechi and Kawamura, 2005)。また、*LWS-1* は網膜の周縁部、特に腹側の領域に発現している (Fig. 5A.)。これらのことから、*LWS-1*<>GFP/*LWS* PAC で網膜に GFP 発現が見られなかったのは、GFP の発現量が少なく、発現している領域も網膜の周縁部で蛍光顕微鏡によって観察することが困難であった可能性が考えられた。そこで、レポーター遺伝子に GFP よりも蛍光強度の強い蛍光タンパク質である Venus (Nagai et al., 2002) の遺伝子を使用してみることにした。*LWS* PAC 中の *LWS-1* を Venus 遺伝子に置換した *LWS-1*<>Venus/*LWS* PAC と、*LWS-2* を Venus 遺伝子に置換した *LWS-2*<>Venus/*LWS* PAC を作製し、ゼブラフィッシュの受精卵に *I-Sce* I と co-injection して、Venus 発現が網膜に見られるかを 7 dpf に観察した。その結果、*LWS-1*<>Venus/*LWS* PAC においても網膜に Venus の発現はなく、松果体のみに Venus の発現がみられる個体が低頻度で確認されたのみであった。レポーター遺伝子を GFP 遺伝子から Venus 遺伝子に変更した効果を調べるためにインジェクションした *LWS-2*<>Venus/*LWS* PAC では、*LWS-2*<>GFP/*LWS* PAC の場合と同様に網膜および松果体で Venus の発現が確認された。しかし、網膜に蛍光の発現がみられる個体（+、++、+++の個体の合計）の割合は、*LWS-2*<>GFP/*LWS* PAC が 71%、*LWS-2*<>Venus/*LWS* PAC が 75%と同様であった (Fig. 9B.)。

LWS 遺伝子は網膜の錐体細胞の内、long members of double cone (LDC) に発現することが知られている (Fig. 2.)。ゼブラフィッシュの LDC のマーカーとしては、Vihtelic らによって抗赤型オプシン抗体が作製されている (Vihtelic et al., 1999)。そこで、この抗体を用い

て *LWS-2<>GFP/LWS PAC* のマイクロインジェクション個体でみられた網膜の GFP 発現
が、本来 *LWS* 遺伝子が発現する LDC において特異的に発現しているのかを確認すること
にした。*LWS-2<>GFP/LWS PAC* を *I-Sce I* と co-injection した個体について、5 dpf の時
点で眼球を摘出して強膜を取り除き、抗赤型オプシン抗体を用いて抗体染色を行った。抗
体染色を行った眼球の網膜を共焦点レーザー顕微鏡で観察して、抗体のシグナルと GFP 蛍
光とが重なるかを確認した (Fig. 13.)。その結果、LDC において GFP 発現が確認された。
Fig. 13.はそれを示した図である。Fig. 13.の (A) ~ (C) は眼球の外側から網膜の中央部
を平面的に捉えた図であり、(D) はその平面を模式的に示した図である。(A) のマゼンダ
は抗赤型オプシン抗体のシグナルであり、網膜中の LDC を示している。(B) の緑色は GFP
蛍光のシグナルである。(C) は (A) と (B) の重ね合わせ画像であり、この視野範囲にお
ける全て GFP 蛍光のシグナルが抗赤型オプシン抗体のシグナルと重なっていることが分か
る。しかし、観察した眼球に見られた全ての GFP 蛍光のシグナルが抗赤型オプシン抗体の
シグナルと重なっていることを確認することはできなかった。

以上のことより、*LWS-2* に関しては、*LWS-2<>GFP/LWS PAC* のマイクロインジェク
ション結果により、*LWS PAC* 中に LDC 特異的な発現制御領域が含まれていることが示さ
れた。今後は、この *LWS-2<>GFP/LWS PAC* を保持したトランスジェニックラインを樹立
して、網膜に見られる全ての GFP 発現が LDC で起きていることを確認する必要がある。
一方 *LWS-1* に関しては、今回の *LWS-1<>GFP/LWS PAC* のマイクロインジェクション結
果により、*LWS PAC* 中に LDC 特異的な発現制御領域が十分に含まれていないことが示唆
された。また、このことから、当研究室で行われた *LWS PAC* 中の *LWS-1* と *LWS-2* のそ
れぞれを GFP 遺伝子と DsRed 遺伝子に置換したコンストラクトにおいて、網膜および松
果体で発現していた GFP の発現が非常に弱かったのは、DsRed の蛍光を GFP 検出用のフ
ィルターが検出していたためである可能性が考えられた。

Ⅲ-2 GFP 発現コンストラクトによる *LWS-2* の発現制御領域の探索

LWS-2 に関しては、*LWS* PAC 中の *LWS-2* を GFP 遺伝子に置換した *LWS-2*<>GFP/*LWS* PAC のマイクロインジェクション結果により、*LWS* PAC 中に LDC 特異的な発現制御領域が含まれていることが示された。そこでこの *LWS-2*<>GFP/*LWS* PAC をテンプレートとして、様々な領域を PCR により増幅して GFP 発現コンストラクトを作製し、それをゼブラフィッシュにマイクロインジェクションすることで *LWS-2* の発現制御領域の探索を行うことにした。Fig. 10. に本研究で *LWS-2*<>GFP/*LWS* PAC をテンプレートとして PCR によって作製した GFP 発現コンストラクトと、そのマイクロインジェクションの結果の一覧を示す。*LWS-2*<>GFP/*LWS* PAC には、*SWS2* 上流約 15.5 kb から *LWS-2* 下流約 54 kb までの領域が含まれている (Fig. 6.)。そこで、*LWS-2* 下流約 54 kb の領域に *LWS-2* の発現制御領域が存在するのかを検証するために、*SWS2* の上流 5.2 kb から *LWS-2* の終止コドンまでの GFP 発現コンストラクト *SWS2* 5'up 5.2 kb を作製した。下流側を *LWS-2* のエキソン 1 と置換した GFP 遺伝子までではなく *LWS-2* の終止コドンまでとしたのは、*LWS-2* のエキソンおよびイントロンにも発現制御領域が含まれている可能性があるためである。この *SWS2* 5'up 5.2 kb をゼブラフィッシュの受精卵にマイクロインジェクションし、GFP 発現が見られるのかを 7 dpf に観察した。その結果、網膜に GFP 発現が確認された個体が全体の 53% を占め、*LWS-2* の下流領域に *LWS-2* の発現制御領域が存在する可能性は低いと考えられた。次に、*SWS2* の上流領域を検証するために、*SWS2* の終止コドンの直下から *LWS-2* の終止コドンまでの GFP 発現コンストラクト *LWS-1* 5'up 2.6kb を作製して、マイクロインジェクションを行った。その結果、網膜に GFP 発現が確認された個体が全体の 62% を占め、*SWS2* の上流領域に *LWS-2* の発現制御領域が存在する可能性は低いことが示された。続いて、*LWS-1* の上流領域を検証するために、*LWS-1* の終止コドンの直下から *LWS-2* の終止コドンまでの GFP 発現コンストラクト *LWS-2* 5'up 1.8kb を作製して、マイ

クロインジェクションを行った。その結果、網膜に GFP 発現の見られる個体は、全体の 3% しか現れなかった (130 個中の 4 個体)。また、GFP 発現の見られる個体は、いずれも網膜での蛍光発現細胞が 1 ~ 10 個の - に分類されるものであった。この結果は、上流領域だけでは発現誘導を行えないとする、当研究室でこれまでに行われた予備的な実験の結果と Luo らの報告(Luo et al., 2004) (これは *LWS-1* についてのみの報告) と一致している。これらのことから、*LWS-1* の上流領域と *LWS-1* のエキソンおよびイントロンに *LWS-2* の発現制御領域が存在することが示唆された。これを踏まえ、*LWS-1* の上流領域と *LWS-1* のエキソンおよびイントロンのどちらの領域に *LWS-2* の発現制御領域が存在するのかを検証するために、*LWS-1* の開始コドンの直上から *LWS-2* の終止コドンまでの GFP 発現コンストラクト *LWS-1* start codon を作製して、マイクロインジェクションを行った。その結果、網膜に GFP 発現の見られる個体は全く現れなかった。このことから、*LWS-1* の上流約 2.6 kb の領域に、*LWS-2* の発現に必要な領域が含まれていることが示された。そこで、*LWS-1* の上流約 2.6 kb の領域内に存在する *LWS-2* の発現に必要な領域を特定するために、*LWS-1* 5'up 2.6kb から *LWS-1* の上流約 2.6 kb の領域を均等に 4 分の 1 ずつ短くした 3 つコンストラクト *LWS-1* 5'up 1.9kb、*LWS-1* 5'up 1.3kb、*LWS-1* 5'up 0.6kb を作製して、マイクロインジェクションを行った。その結果、網膜に GFP 発現が確認された個体の割合が、*LWS-1* 5'up 1.9kb では 36%、*LWS-1* 5'up 1.3kb では 23%、*LWS-1* 5'up 0.6kb では 0.7% となり、*LWS-1* の上流領域が上流から短くなるほど GFP 発現が見られなくなることが分かった。特に *LWS-1* 5'up 0.6kb に関しては、*LWS-1* の上流領域を全く含まない *LWS-2* 上流領域のみの *LWS-2* 5'up 1.8kb と同様の結果であり、*LWS-1* の上流 0.6 kb の領域には *LWS-2* の発現制御領域が存在しないことが示された。*LWS-1* 5'up 1.9kb の結果を *LWS-1* 5'up 2.6kb の結果と比較すると、網膜で蛍光発現の見られる個体の割合が 62% から 36% に減少しているが、観察対象としているのがトランジェントトランスジェニック個体であるため、この差によって *LWS-1* の上流 2.6 kb から 1.9 kb までの領域を判断することは難しい。このこと

は *LWS-1* 5'up 1.9kb の結果を *LWS-1* 5'up 1.3kb の結果と比較する場合にも当てはまる。よって、*LWS-1* の上流領域に関しては、先に述べた通り、上流 0.6kb の領域には *LWS-2* の発現制御領域が存在しないということだけが示され、*LWS-2* の発現制御領域は *LWS-1* の上流 2.6 kb から 0.6kb の領域に存在することが考えられる。また、*LWS-2* のエキソンおよびイントロンにおける発現制御領域の存在の検証は、*LWS-1* 5'up 2.6kb ~ pA によって行った。*LWS-1* 5'up 2.6kb ~ pA は *SWS2* の終止コドンの直下から GFP-CAT カセット中の SV40 poly A シグナルまでの GFP 発現コンストラクトである。このコンストラクトをマイクロインジェクションしたところ、網膜で蛍光発現の見られる個体の割合が 78% となった。この結果から、*LWS-2* のエキソンおよびイントロンには *LWS-2* の発現制御領域が存在しないことが示された。

III-3 *LWS-1* 上流領域における *LWS-2* の発現制御領域の探索

LWS PAC 中の *LWS-2* を GFP 遺伝子に置換した *LWS-2*<>GFP/*LWS* PAC をテンプレートとして、様々な領域を PCR により増幅して GFP 発現コンストラクト作製し、それをゼブラフィッシュにマイクロインジェクションすることで *LWS-2* の発現制御領域の探索を行ったところ、*LWS-1* の上流 2.6 kb から 0.6 kb の領域に *LWS-2* の発現制御領域が存在することが示された。そこで、さらに *LWS-1* 上流領域における *LWS-2* の発現制御領域の探索を進めるために、*LWS-2* の上流領域 (1.8 kb) を含み、単独でインジェクションした場合には GFP 発現がほとんど見られない *LWS-2* 5'up 1.8kb と *LWS-1* 上流領域の DNA 断片の co-injection を行った。Fig. 11. に本研究で作製した *LWS-1* 上流領域 DNA 断片とその *LWS-2* 5'up 1.8kb との co-injection の結果の一覧を示す。まず、co-injection の実験系の有効性を検証するために、*LWS-1* 上流領域の全領域である、*SWS2* の終止コドンの直下から *LWS-1* の開始コドン直上までの DNA 断片 *LWS-1* 5'up 2.6 ~ 0kb を作製し、ゼブラフィッシュの

受精卵に *LWS-2* 5'up 1.8kb と共に co-injection した。co-injection した個体に GFP 発現が見られるのかを 7 dpf に観察したところ、網膜に GFP 発現が確認された個体が全体の 72% となり、co-injection によって DNA が別々に導入された場合でも *LWS-1* 上流領域と *LWS-2* の上流領域によって *LWS-2* の発現が誘導されることが示された。次に、*LWS-1* 5'up 0.6kb のマイクロインジェクションの結果により、*LWS-1* 上流領域の中で *LWS-2* の発現制御領域が存在しないことが示されている *LWS-1* 直上 0.6kb の領域を *LWS-1* 5'up 2.6 ~ 0kb から除いた DNA 断片である *LWS-1* 5'up 2.6 ~ 0.6kb を *LWS-2* 5'up 1.8kb と共に co-injection した。その結果、網膜に GFP 発現が確認された個体が全体の 77% となった。この結果は *LWS-1* 5'up 2.6 ~ 0kb の co-injection の結果と同様であり、co-injection においても *LWS-1* 直上 0.6kb の領域に *LWS-2* の発現制御領域が存在しないことが示された。続いて、この *LWS-1* 5'up 2.6 ~ 0.6kb からさらに領域を絞り込むために、上流側を 3分の1 削った *LWS-1* 5'up 1.9 ~ 0.6kb と下流側を 3分の1 削った *LWS-1* 5'up 2.6 ~ 1.3kb を作製して、*LWS-2* 5'up 1.8kb と共に co-injection した。その結果、*LWS-1* 5'up 1.9 ~ 0.6kb では網膜に GFP 発現が確認された個体が全体の 32% 存在したが、*LWS-1* 5'up 2.6 ~ 1.3kb では GFP 発現が確認された個体が全体の 1% (89 個体中 1 個体のみ) となった。さらに領域を絞り込むために、GFP 発現が確認された方の *LWS-1* 5'up 1.9 ~ 0.6kb を均等に 2 つに分けた DNA 断片である *LWS-1* 5'up 1.9 ~ 1.3kb と *LWS-1* 5'up 1.3 ~ 0.6kb を作製した。これら 2 つの DNA 断片を *LWS-2* 5'up 1.8kb と共に co-injection したところ、下流側の *LWS-1* 5'up 1.3 ~ 0.6kb では網膜に GFP 発現が確認された個体が全体の 50% 存在したのに対し、上流側の *LWS-1* 5'up 1.9 ~ 1.3kb では網膜に GFP 発現の見られる個体は全く現れなかった。以上のことから、*LWS-1* 上流 1.3 kb から 0.6 kb までの領域と *LWS-2* の上流領域の両方が *LWS-2* の発現に必要であることが示された。

IV 考察

IV-1 PAC 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、上流領域だけでは発現誘導を行えないことが分かっていたゼブラフィッシュの *LWS-1* と *LWS-2* に対し、*LWS-1* と *LWS-2* の両方を含む長インサート PAC クローンを用いたレポーター遺伝子発現コンストラクトを作製し、ゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションを行うことで、レポーター遺伝子発現を観察している。この方法を用いることにより、対象とする遺伝子の直上の領域や直下の領域だけでなく、広範囲における発現制御領域の探索が可能となった。また、ゼブラフィッシュの *LWS-1* と *LWS-2* はゲノム中でタンデムに重複した遺伝子群を形成しており (Fig. 3.)、それらはサブタイプ間で異なる発現制御下に置かれていると考えられる。そのため、それらの遺伝子群の構造を維持したまま発現制御機構を解析することは重要であると考えられる。実際に本研究では、PAC クローン中の *LWS-1* を GFP 遺伝子に置換したコンストラクトと、*LWS-2* を GFP 遺伝子に置換したコンストラクトを用いてその GFP 発現が検証された。*LWS-2* に関しては、網膜と松果体における GFP 発現が誘導され、網膜で GFP を発現している細胞が本来 *LWS* 遺伝子が発現する LDC であることを確認した。このことから、*LWS-2* の LDC 特異的な発現を制御している領域がこの PAC クローン中に十分に含まれていることが示された。一方、*LWS-1* に関しては、本研究において PAC クローンを用いてその発現を再現することはできなかった。PAC クローンには *LWS-1* と *LWS-2*、そしてその上流に位置する *SWS2* を含む全長約 80 kb のインサートがサブクローニングされており (Fig. 6.)、PAC クローン中に *LWS-1* の発現を制御する領域が含まれていないとは考えにくい。本研究において PAC クローン中に含まれない領域に *LWS-1* の発現を制御する領域が存在する可能性が出てきた。しかし、本研究で対象としているのは、マイクロインジェクションされた外来遺伝子をト

ランジェントで保持しているランジェントトランスジェニック個体である。そのため、外来遺伝子を全ての視細胞が持っているとは限らない。このことから、今後は *LWS-1* と *LWS-2* のそれぞれのレポーター遺伝子発現 PAC コンストラクトを保持したトランスジェニックラインを樹立して、そのレポーター遺伝子の発現を確認することが必要である。

IV-2 *LWS-2*の発現制御領域について

本研究では、LDC での GFP の発現が確認された *LWS-2* の GFP 発現 PAC コンストラクトをもとにして、様々な領域を含む GFP 発現コンストラクトを作製することで、*LWS-2* の発現制御領域の探索を行った。これらの研究対象は全てランジェントトランスジェニック個体であるが、網膜での GFP 発現を 4 つのステージに分類して集計することで GFP 発現を定量化し、マイクロインジェクションの結果を評価した。それにより、*LWS-2* の発現には *LWS-2* の上流領域と *LWS-1* の上流 1.3 kb から 0.6 kb までの領域が必要であることが示唆された。この結果については、観察対象がランジェントトランスジェニック個体であることと、実際に GFP を発現している細胞が本来 *LWS* 遺伝子が発現する LDC であるかが確認されていないという問題点がある。しかし、*LWS-1* の上流 1.3 kb から 0.6 kb までの領域が本当に *LWS-2* の発現に必要な領域であるとしたら、遺伝子重複によって生じたサブタイプにおいて、他のサブタイプの上流領域からの発現制御を受けていることになる。重複遺伝子間の発現制御機構に関しては、先に述べたゼブラフィッシュの RH2 遺伝子群に見られる RH2-RCR の知見などの他に、ヒトの M/LWS 遺伝子の発現制御機構に関する知見が得られている。ヒトの M/LWS 遺伝子は、locus control region (LCR) により制御されていることが示されている(Nathans et al., 1989; Wang et al., 1992; Wang et al., 1999; Smallwood et al., 2002)。LCR とは、ゲノム上で一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、その全体の発現を制御する発現制御領域のことである。各遺伝子

の直上プロモーターとの相互作用によって発現を誘導し、各遺伝子の発現領域や時期を決定する役割をもっている。ヒトの X 染色体には、遺伝子重複によって生じた 2 つ（またはそれ以上）の M/LWS 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細胞に発現している。上流側の赤オプシン遺伝子の上流 3.7 kb から 3.1 kb の領域が LCR として機能し、赤オプシン遺伝子または緑オプシン遺伝子それぞれの直上領域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 1 つの遺伝子の発現が誘導されている。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 1 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、1 つの視細胞からは 1 種類のオプシンのみが特異的に発現する仕組みになっている。ゼブラフィッシュの LWS 遺伝子も重複によりサブタイプを生じ、その後に機能分化したという点でヒトの M/LWS と類似している。本研究により、*LWS-2* がサブタイプである *LWS-1* の上流領域の発現制御を受けている可能性が示唆された。*LWS-1* に関しては未だその発現を再現できるレポーター遺伝子発現コンストラクトを確立できていないが、今後の解析によってこの *LWS-1* の上流領域が *LWS-1* の発現制御にも関与していることが明らかにされれば、ゼブラフィッシュの RH2 遺伝子群に見られる RH2-RCR などと共に、重複遺伝子間における発現制御機構の新たな知見になると期待される。

V 謝辞

本研究を行うにあたり、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は、多大な協力と終始熱心なご指導を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 博士には抗赤型オプシン抗体を御分与していただきました。厚く御礼申し上げます。

理化学研究所 脳科学総合研究センターの宮脇敦史教授には Venus を使用することに御快諾していただき、当専攻の動物生殖システム分野の尾田正二講師には Venus 発現ベクターを御分与していただきました。厚く御礼申し上げます。

実験機器を快く貸していただいた当専攻の医薬デザイン工学分野の皆様に御礼申し上げます。

最後に、研究室生活の全てにおいて御協力や激励していただきました人類進化システム分野の皆様に深く感謝いたします。

VI 引用論文

- Amsterdam, A., Lin, S. and Hopkins, N.: The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev Biol* 171 (1995) 123-9.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y. and Eguchi, G.: High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev Biol* 192 (1997) 289-99.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K. and Miyawaki, A.: A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20 (2002) 87-90.
- 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.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M. and Miyano, M.: Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289 (2000) 739-45.

- 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.
- 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.
- Takechi, M. and Kawamura, S.: Temporal and spatial changes in the expression pattern of multiple red and green subtype opsin genes during zebrafish development. *J Exp Biol* 208 (2005) 1337-45.
- 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.

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.

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

辻村太郎： 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

平成 16 年度 当専攻修士学位論文

VII 图表



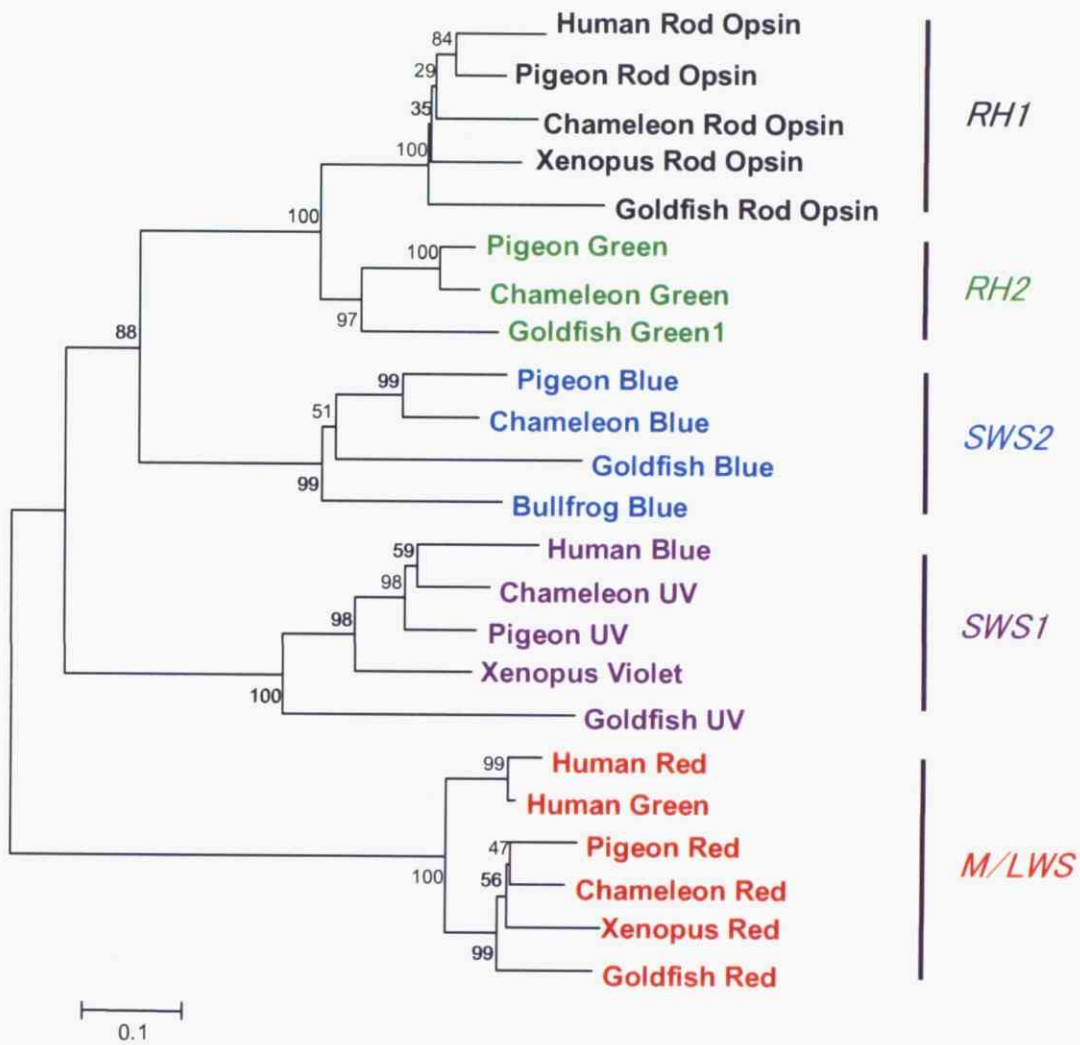


Fig. 1.
 脊椎動物視物質遺伝子の進化系統樹。
 アミノ酸配列をもとに近隣結合法で作成した。それぞれの分岐点に信頼度(bootstrap value)を示している。

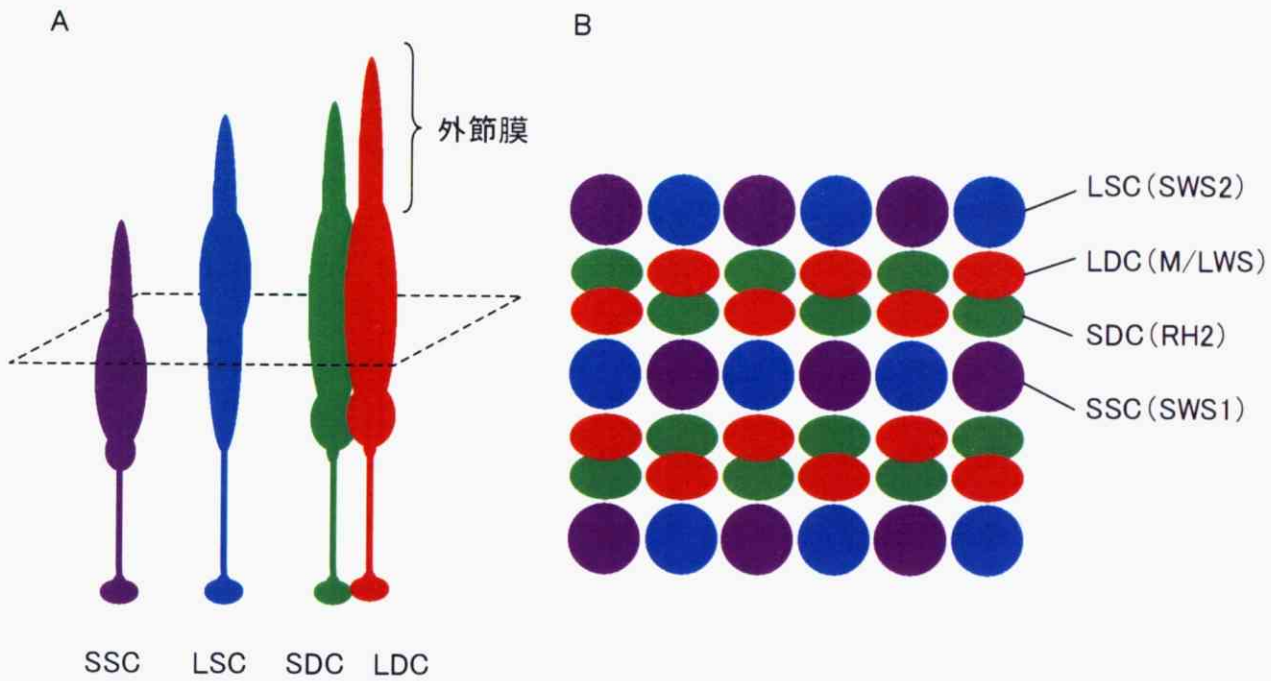


Fig. 2.

ゼブラフィッシュ錐体細胞の模式図.

(A) 4種類の錐体細胞を網膜の断面方向から見た図. 図に示されている外節膜中に視物質が局在している. 点線で示した部分を平面的に見たときの図が(B)となる.

(B) 網膜を平面で見たときの錐体細胞の並びを示した図. 各錐体細胞は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.

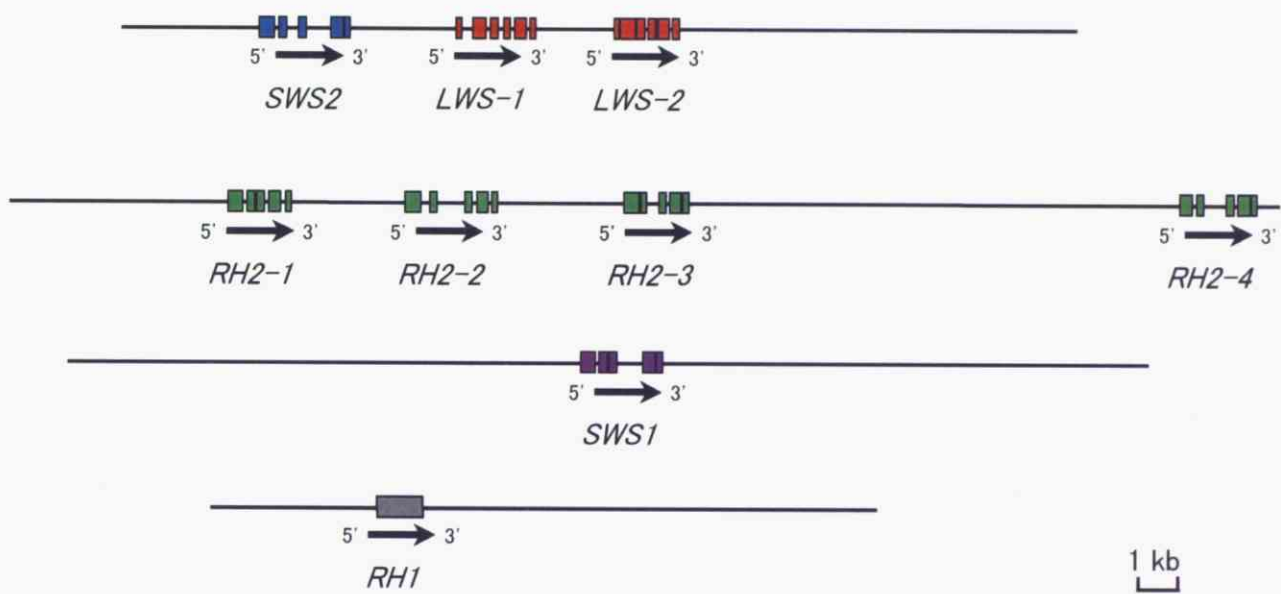


Fig. 3.

ゼブラフィッシュ全視物質遺伝子のゲノム構造.

矢印は遺伝子の向きを示し、色付きの四角はエキソンを示す.

LWS遺伝子には2つ、RH2遺伝子には4つのサブタイプ遺伝子が存在する.

A

| 錐体視物質遺伝子 | λ max |
|--------------|-----------------|
| <i>SWS1</i> | 354.6 \pm 0.5 |
| <i>SWS2</i> | 416.0 \pm 1.0 |
| <i>RH2-1</i> | 466.5 \pm 1.5 |
| <i>RH2-2</i> | 475.7 \pm 0.5 |
| <i>RH2-3</i> | 488.0 \pm 0.0 |
| <i>RH2-4</i> | 504.9 \pm 0.7 |
| <i>LWS-1</i> | 557.7 \pm 3.3 |
| <i>LWS-2</i> | 548.3 \pm 0.5 |
| <i>RH1</i> | 500.6 \pm 0.5 |

B

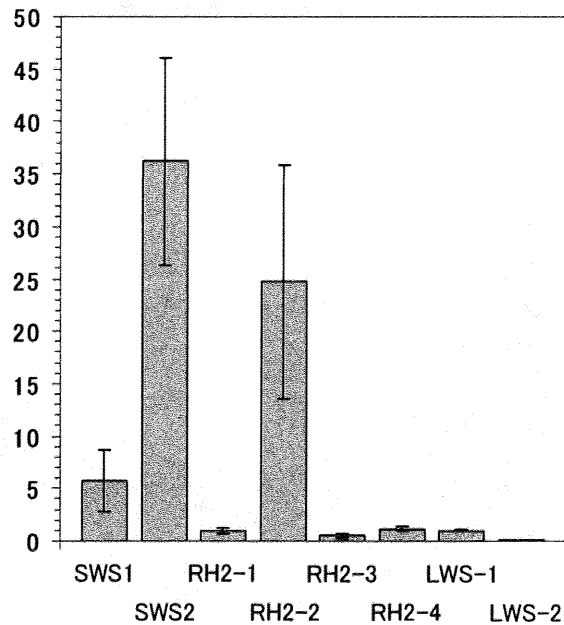


Fig. 4.

(A)ゼブラフィッシュ視物質の光吸収特性.

各視物質の最大吸収波長 (λ max) の値を示す.

(B)ゼブラフィッシュ視物質遺伝子の相対発現量.

生後6ヶ月以降の成魚からライト点灯後1.5時間後に眼球を摘出してRNAを抽出し、real time RT-PCRによって調べたもの。*LWS-1*を1としたときの各視物質遺伝子の相対発現量を示す。

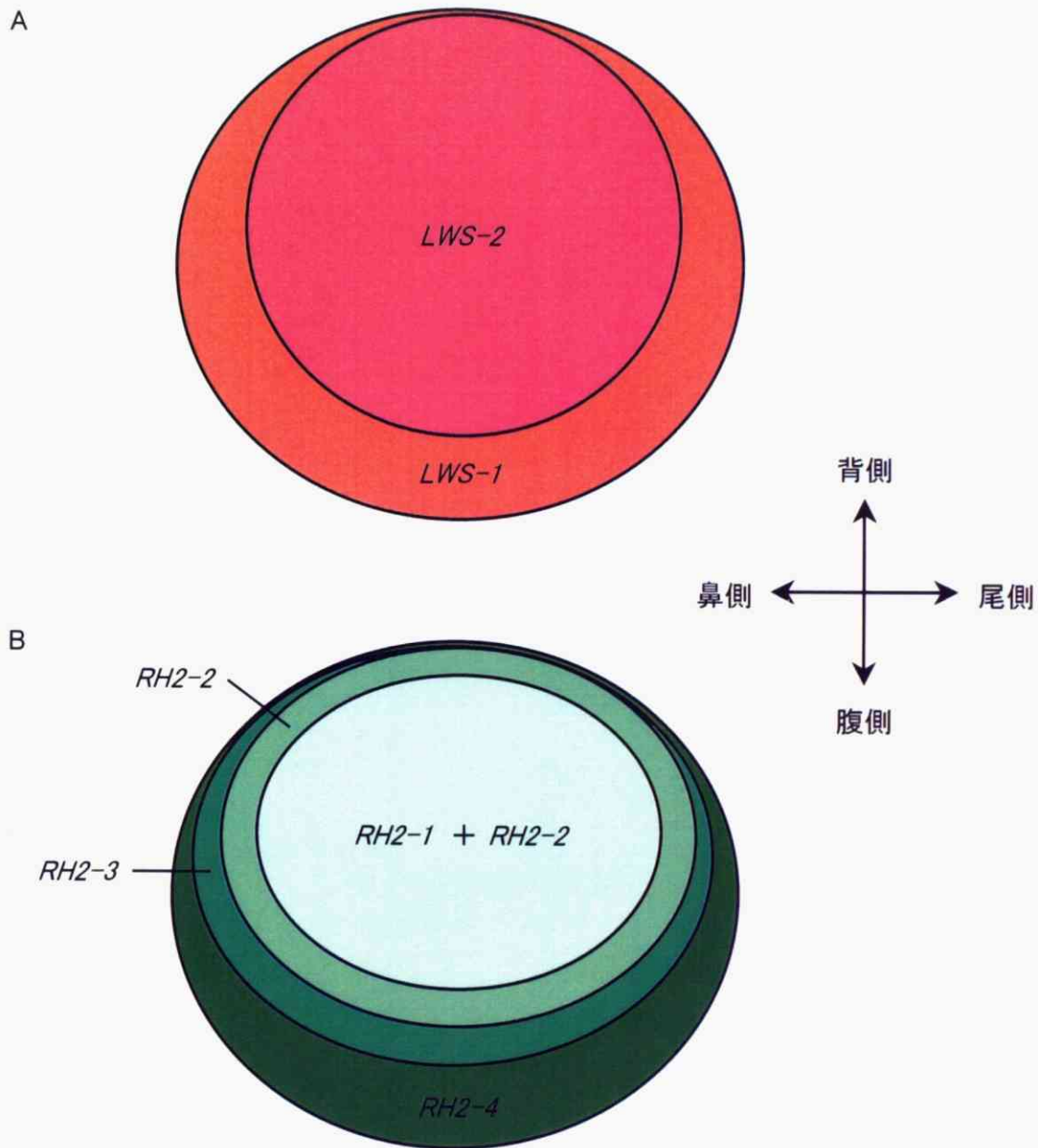


Fig. 5.
 ゼブラフィッシュ成魚網膜におけるRH2およびLWSサブタイプ遺伝子の発現分布.
 (A)LWS遺伝子. (B)RH2遺伝子.

LWS PAC

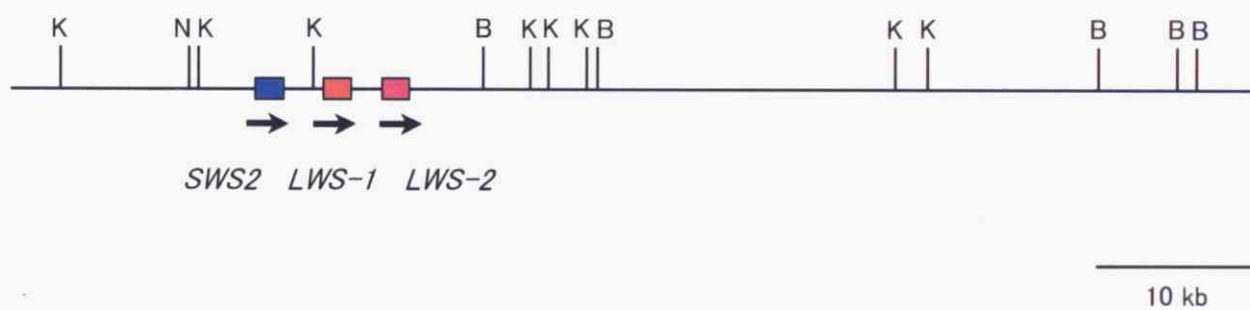
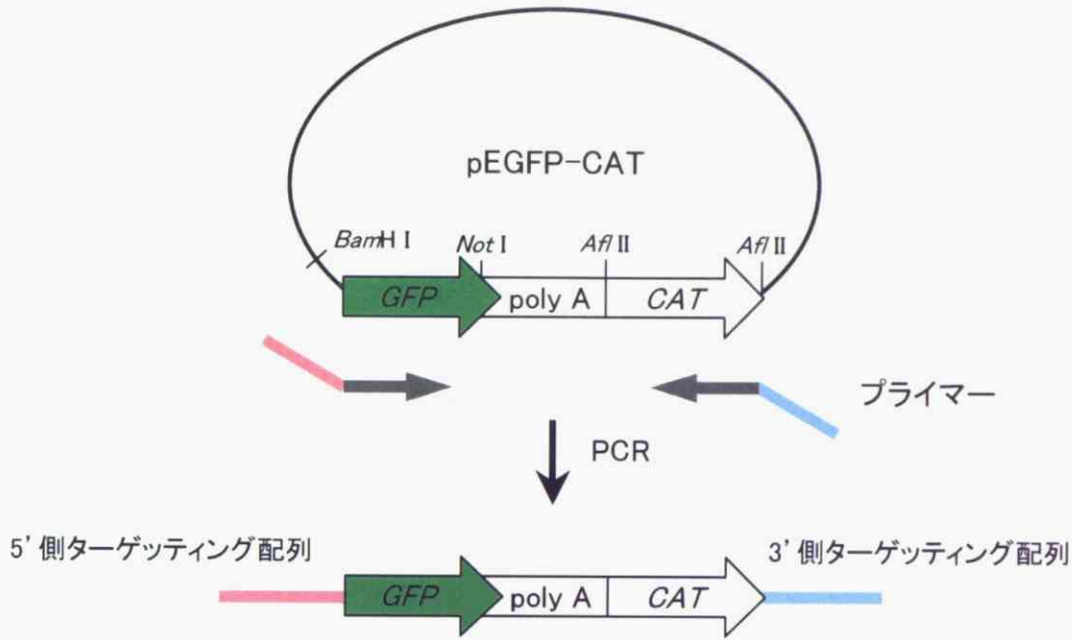


Fig. 6.
LWS PACの制限酵素地図.
B: *Bam*H I, K: *Kpn* I, N: *Not* I

A



B

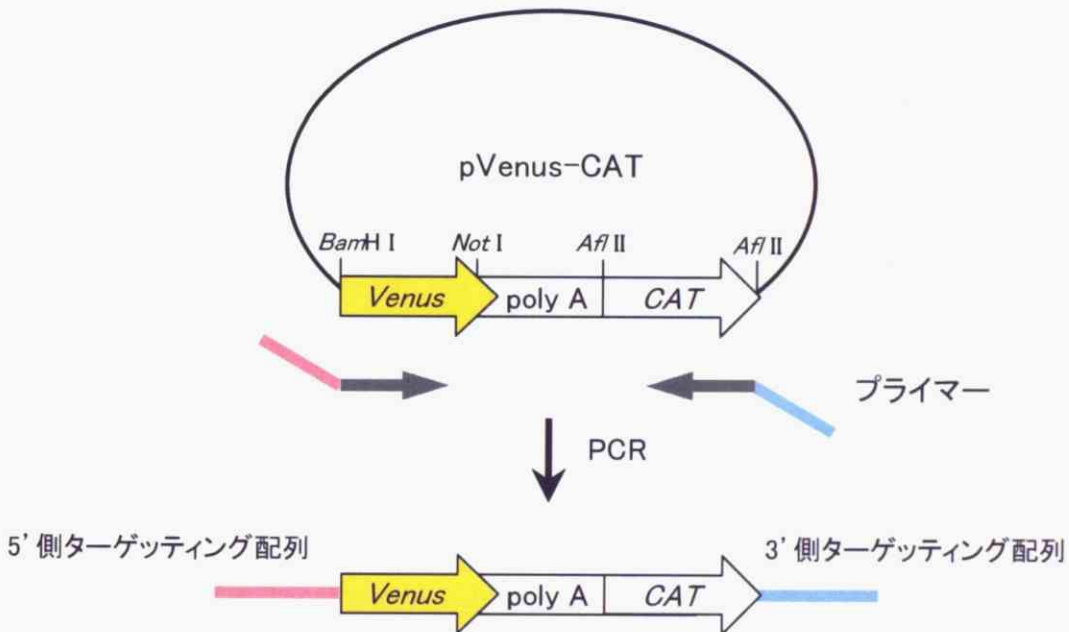


Fig. 7.

LWS PACの相同組換えに用いたターゲティングDNA断片の作製.

プライマーに45 bp程度のLWS PACの配列に相同なターゲティング配列を付加し、PCRによって両端にターゲティング配列をもつターゲティングDNA断片を作製した.

(A) pEGFP-CATからのGFP-CATカセットをもつターゲティングDNA断片の作製.

(B) pVenus-CATからのVenus-CATカセットをもつターゲティングDNA断片の作製.

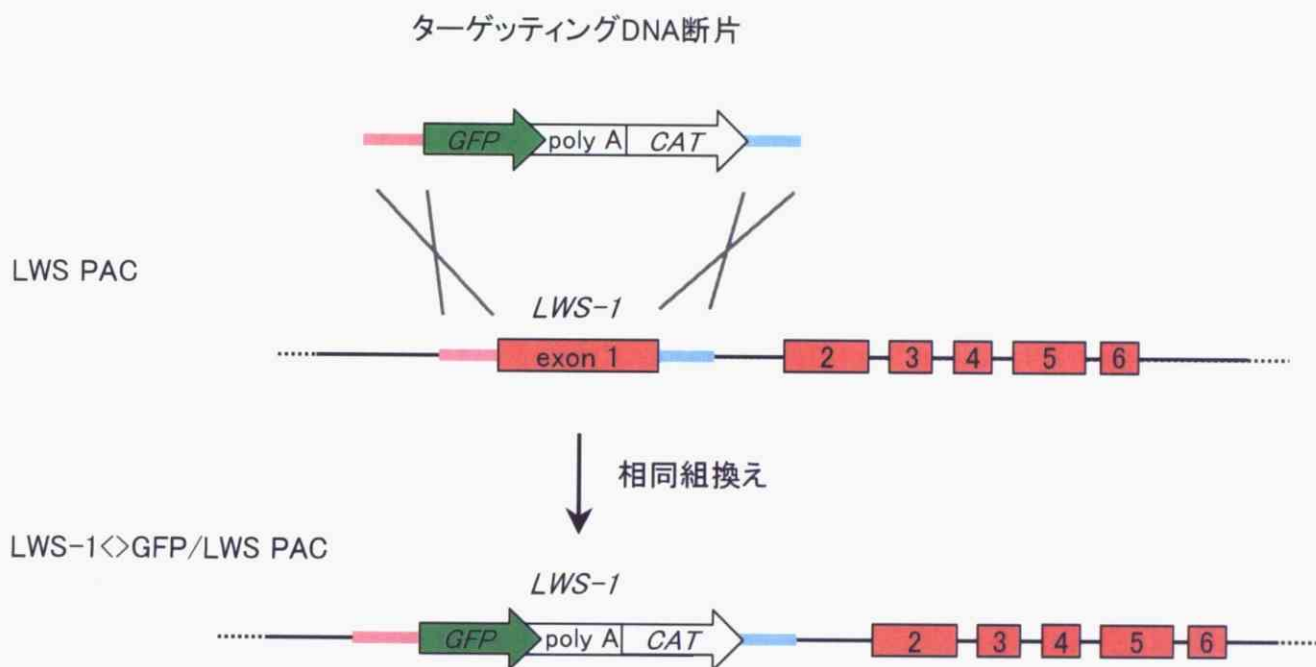


Fig. 8.

LWS PACの相同組換え.

LWS PAC 中の *LWS-1*、*LWS-2* のエクソン1を相同組換えによってGFP-CATカセットまたはVenus-CATカセットに置換した。図は *LWS-1* のエクソン1とGFP-CATカセットとの相同組換えを示している。

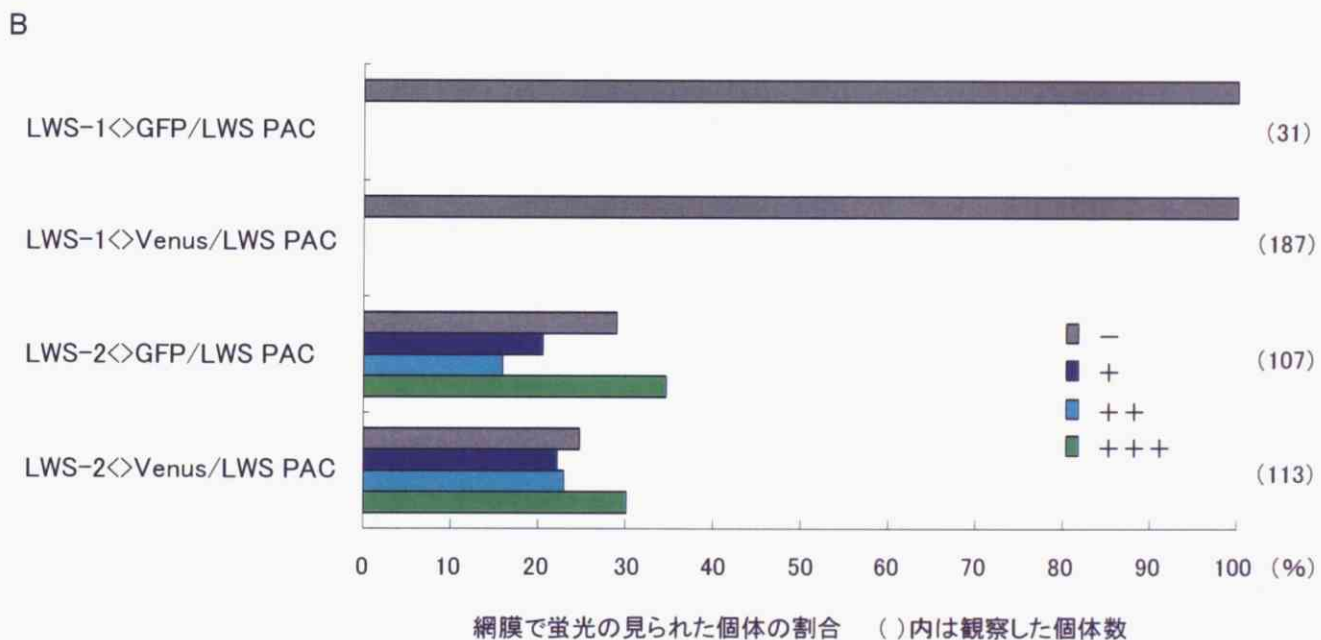
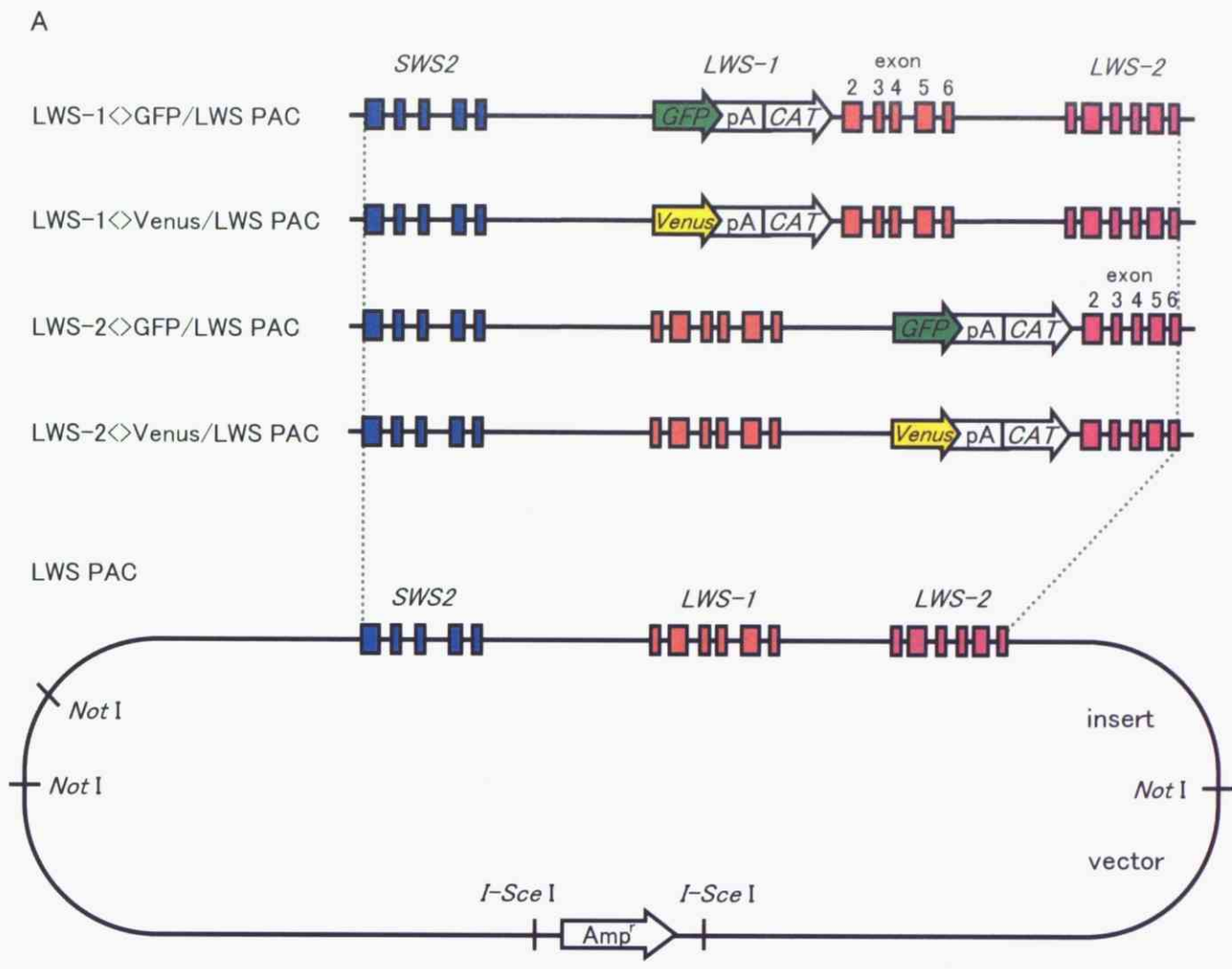


Fig. 9.

(A) LWS PACと相同組換えによって作製したGFP(またはVenus)発現PACコンストラクト.

(B) GFP(またはVenus)発現PACコンストラクトのマイクロインジェクションの結果.

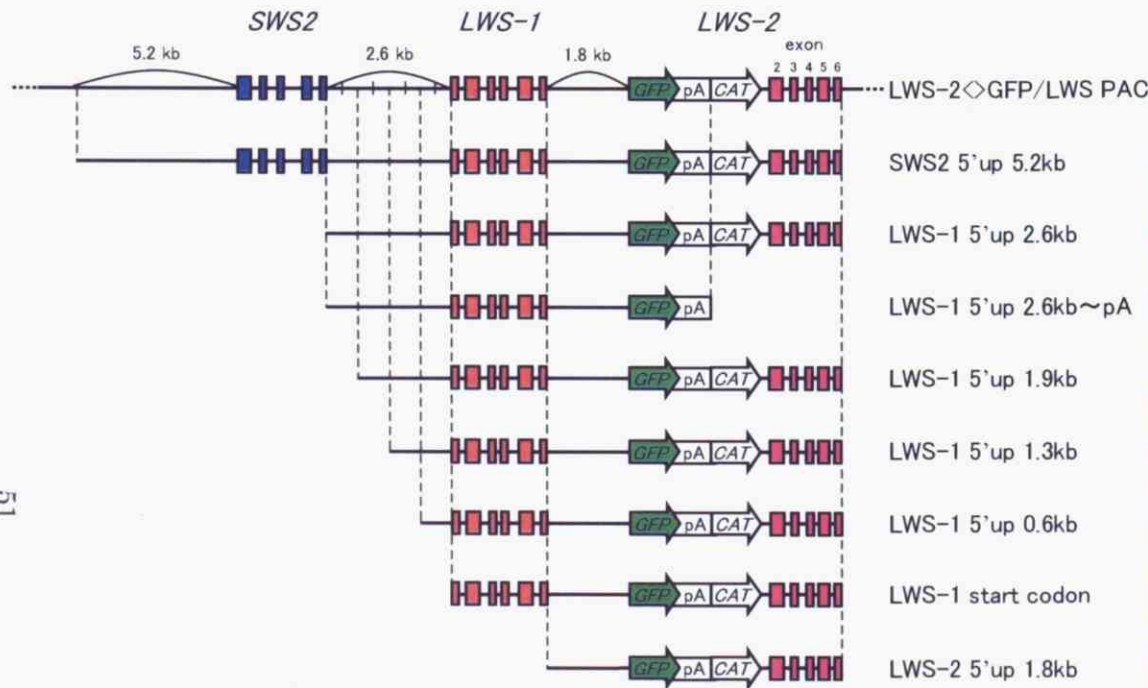
—: 網膜に蛍光発現が見られない個体

+: 網膜における蛍光発現細胞が1 ~ 10個

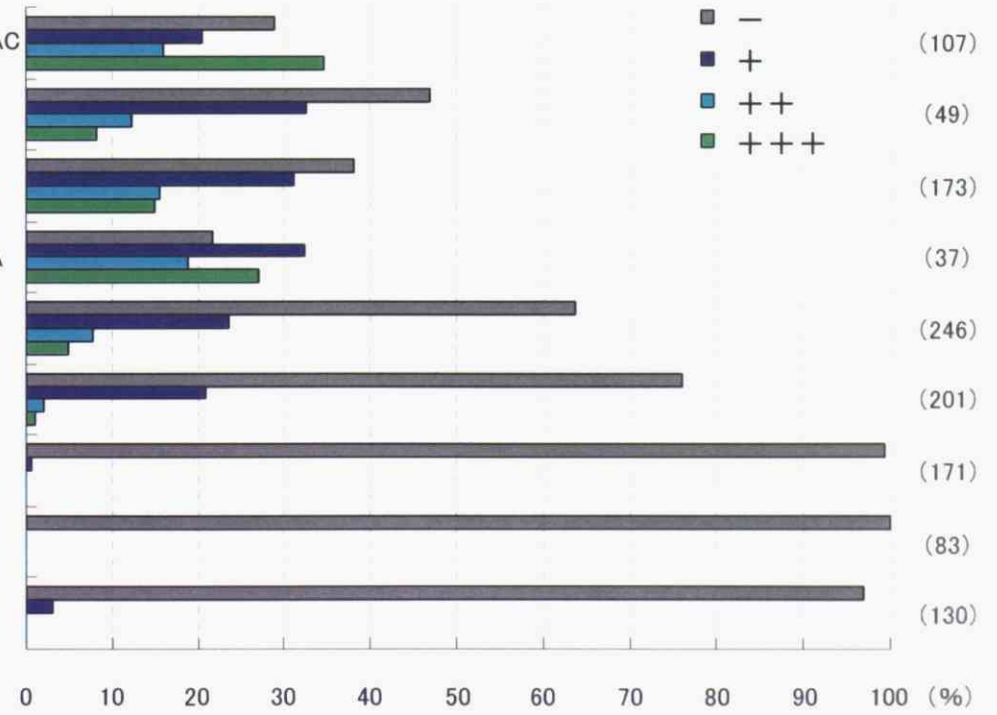
++: 網膜における蛍光発現細胞が11 ~ 50個

+++ : 網膜における蛍光発現細胞が50個以上

A



B



網膜で蛍光の見られた個体の割合 ()内は観察した個体数

Fig. 10.

(A) LWS-2 \diamond GFP/LWS PACをテンプレートとしてPCRによって作製したGFP発現コンストラクト.

(B) GFP発現コンストラクトのマイクロインジェクションの結果.

—: 網膜に蛍光発現が見られない個体

+: 網膜における蛍光発現細胞が1 ~ 10個

++: 網膜における蛍光発現細胞が11 ~ 50個

+++ : 網膜における蛍光発現細胞が50個以上

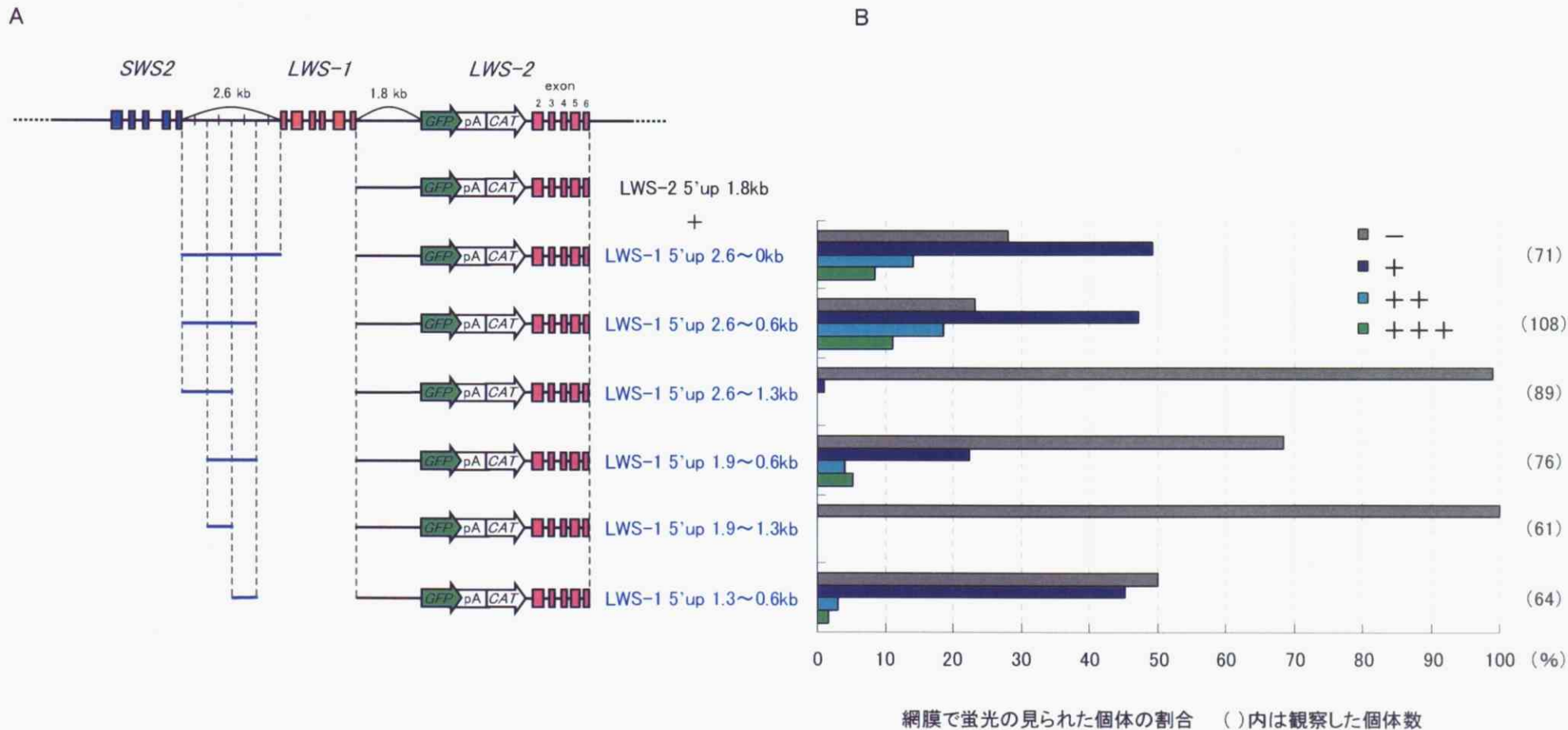


Fig. 11.
 (A) LWS-2 5'up 1.8kbとのco-injectionに用いたLWS-1上流領域DNA断片.
 青線と青字で示しているのがLWS-1上流領域DNA断片である.
 (B) LWS-2 5'up 1.8kbとLWS-1上流領域DNA断片とのco-injectionの結果.
 -: 網膜に蛍光発現が見られない個体
 +: 網膜における蛍光発現細胞が1 ~ 10個
 ++: 網膜における蛍光発現細胞が11 ~ 50個
 +++: 網膜における蛍光発現細胞が50個以上



Fig. 12.
LWS-2<>GFP/LWS PACをマイクロインジェクションしたゼブラフィッシュの幼生(7 dpf).
網膜と松果体でGFP蛍光が観察された。矢印は松果体におけるGFP蛍光を示す。
(A)頭部周辺の透過光像。(B)GFP蛍光。(C)(A)と(B)の重ね合わせ画像。

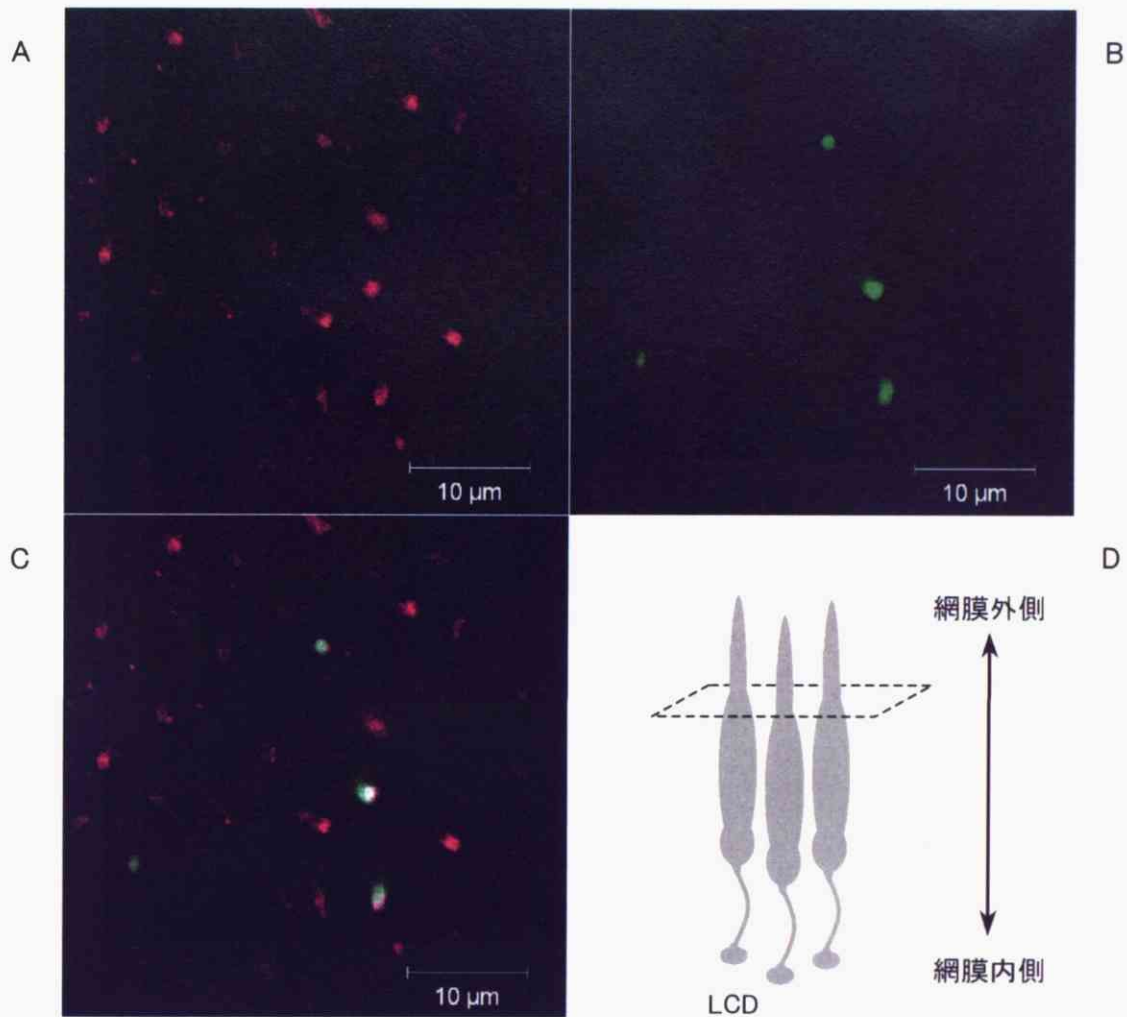


Fig. 13.

LWS-2<>GFP/LWS PACをマイクロインジェクションしたゼブラフィッシュの網膜(5 dpf).
 (A)～(C)は眼球の裏側から網膜の中央部を平面的に捉えた画像であり、(D)はその平面を模式的に示した図である.

(A) 抗赤型オプシン抗体による抗体染色(マゼンダ)

(B) GFP蛍光(緑色)

(C) (A)と(B)の重ね合わせ画像

Ⅷ 付記

本文中に記載のない試薬の組成

1×PBS

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

1.8 mM KH₂PO₄

adjusted pH to 7.4