

論文内容の要旨

論文題目

Analysis of Expression Pattern of Multiple Red and Green Subtype Opsin Genes and Identification of *Cis*-regulatory Regions of Blue and UV Type Opsin Genes in Zebrafish

(ゼブラフィッシュ赤, 緑タイプ視物質遺伝子の発現パターンの解析及び青, 紫外線タイプ視物質遺伝子の発現制御領域の検討)

氏名

武智 正樹

【序論】

色覚は採食行動, 配偶行動, 捕食者の識別など、動物の生存に密接に関わる重要な感覚の一つである。網膜の視細胞には光受容物質である視物質が産生されており、7 回膜貫通型タンパク質のオプシンとレチナールから成る。脊椎動物の視物質は進化系統的に5タイプに分かれる。桿体細胞に産生されて薄明視を担う RH1 (桿体タイプ) と、錐体細胞に産生されて色覚を担う M/LWS (赤タイプ), RH2 (緑タイプ), SWS2 (青タイプ), SWS1 (紫外線タイプ) である。色覚が成立するためにはこれら異なる吸収光特性をもつ視物質を複数有し、それらを異なる視細胞で発現させることが不可欠である。しかしこの1視細胞1視物質ルールを成立させるために必要な視物質遺伝子の発現制御機構はその多くが未知である。

脊椎動物の中でも魚類の多くは5タイプ全ての視物質を有しており、その発現制御機構を検討する良いモデルとなる。そこでトランスジェネシスによる遺伝子発現制御領域の検討法が確立されているゼブラフィッシュを用いることで視物質遺伝子の発現制御機構の解明を目指した。ゼブラフィッシュの視細胞には桿体細胞 (Rod) と4種類の錐体細胞 Short Single Cone (SSC), Long Single Cone (LSC), Short members of Double Cone (SDC), Long members of Double Cone (LDC)が存在する (図1)。

当研究室がゼブラフィッシュの全視物質遺伝子レポーターを魚類で初めて明らかにしたところ、遺伝子重複によって赤タイプには2種類(*LWS-1, -2*)、緑タイプには4種類(*RH2-1, -2, -3, -4*)のサブタイプが存在し、吸収光特性が全て異なっていることを示した。しかしこれらのサブタイプが同じ錐体細胞で発現するのか、異なるとすれば網膜上でどのような空間配置を示すのかは不明であった。よって本研究では、まず①赤タイプ, 緑タイプ視物質遺伝子の幼魚から成魚における発現パターンを *in situ*

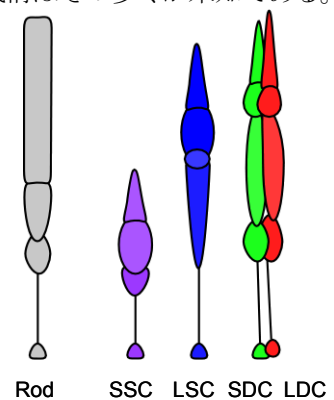


図1 ゼブラフィッシュ網膜視細胞

hybridization により調べることにした。次に錐体視物質タイプ間の発現制御を比較検討するため、単一コピー遺伝子の②青タイプ (*SWS2*)と③紫外線タイプ (*SWS1*)視物質遺伝子について、GFP レポーターを用いたトランスジェネシスによって各遺伝子の発現制御領域を検討した。またこの過程で樹立される特定の視細胞のみが GFP 標識された「視細胞可視化ゼブラフィッシュ」は生体のまま視細胞の挙動を観察できるため、視細胞発生に異常をきたす突然変異体スクリーニング等において有用なツールとなる。そこで発現制御領域の検討と同時に特定の視細胞を可視化したトランスジェニックゼブラフィッシュの樹立を目的とした。

【結果と考察】

① 赤タイプ、緑タイプ視物質遺伝子の時間的空間的な発現パターン

①-1 初期胚（～受精後 3 日）と幼生（受精後 3 日～1 ヶ月）における発現

LWS-2 は受精後約 40 時間、*RH2-1* は 45 時間において網膜腹側でスポット状に発現を開始し、その後網膜全体に広がるという、既知の視物質遺伝子と同様の発現パターンを示した。*RH2-1* に遅れて受精後 3 日目以降に *RH2-2* も発現を開始し、約 1 週間で網膜全体に発現が見られた（図 2B）。一方で、*LWS-1* と *RH2-3/RH2-4* は受精後 1 週間までに網膜周縁部で非常に弱く発現が見られたが、網膜全体には広がらず、視物質遺伝子における新規の発現パターンを示した（図 2A, B: 1 week）。

①-2 幼魚から成魚における発現—赤タイプ（図 2A）

幼魚（受精後 1~2 ヶ月）と成魚（受精後 2 ヶ月～）においては、*LWS-2* は網膜中央～背側領域に非常に弱く発現する一方で、*LWS-1* は周縁部+腹側領域に強く発現していた（図 2A）。つまり両遺伝子は網膜上での発現領域が異なり、さらに発現量が幼生時と逆転していた。また興味深いことに中央～背側領域に *LWS-1* と *LWS-2* が共発現している視細胞が散在していた（図 2C）。

①-3 幼魚から成魚における発現—緑タイプ（図 2B）

受精後 1 ヶ月の幼魚では、網膜全体に発現していた *RH2-1* は網膜周縁部での発現が見られず、反対に *RH2-2* は中央部での発現が完全に消失した。*RH2-3/2-4* は網膜腹側+周縁部に発現が見られた。生後 2 年の成魚になると *RH2-1, -2* は共に再び網膜中央～背側に発現していたが、*RH2-2* の発現の方が強かった。またこの領域では同一視細胞において *RH2-1* と *RH2-2* が共発現していた（図 2D）。*RH2-3* は *RH2-2* 発現領域の外側に、*RH2-4* は *RH2-3* の外側すなわち網膜周縁部+腹側に発現していた。

以上の結果より、赤タイプ、緑タイプともに幼生では最も短波長感受性のサブタイプが先に発現するが、成魚では長波長感受性寄りのサブタイプが主に発現するよう

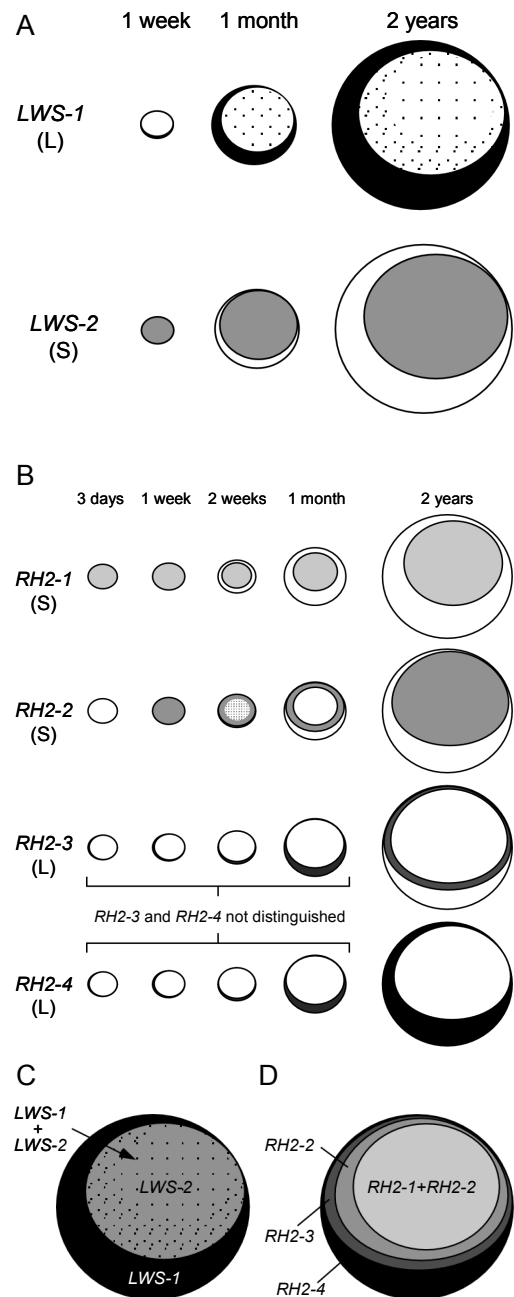


図 2 ゼブラフィッシュ網膜における赤タイプ (A), 緑タイプ (B) 視物質遺伝子の発現パターン。成魚における各サブタイプの発現パターンを重ね合わせたものを C, D に示す。上が背側、左が前側を示す。(S) は短波長感受性サブタイプ、(L) は長波長感受性サブタイプを表す。発表論文3より改変。

に切り替わった (*LWS-2*→*LWS-1*, *RH2-1*→*RH2-2*: サブタイプ間の時間的発現パターンの相違)。また各成長時期において、サブタイプによって網膜での発現領域が異なることを明らかにした (サブタイプ間の空間的発現パターンの相違)。興味深いことに赤タイプ、緑タイプとも短波長感受性のサブタイプが網膜中央～背側に、長波長感受性のサブタイプが網膜周縁部+腹側に発現していた (図 2C, D)。以上の結果から、ゼブラフィッシュは重複した視物質サブタイプを網膜で異なる時間および空間で発現させることにより、成長時期や視野によってきめ細かく異なる波長感受性の調節を行っていることが示唆された。

② 青タイプ視物質遺伝子 (*SWS2*) の発現制御領域の検討

SWS2 の様々な長さの上流領域を GFP レポーターにつないでゼブラフィッシュ受精卵に導入し、約 1 週間後における導入個体の GFP 蛍光を観察した。その結果、LSC 特異的な発現には上流 582 bp が十分であったが、上流 300 bp では発現が誘導されなかった。次に発現誘導が可能な上流 1.4 kb から、-595~-282 領域を様々な欠失させたコンストラクトを作製し、同様に導入個体における GFP 蛍光を観察した (図 3)。-595~-404, -497~-282 の欠失 (図 3: DEL-1, DEL-2) では発現が誘導されなかった。一方で -404~-282 の欠失 (図 3: DEL-5) では LSC と同様に SSC での異所的な発現が誘導された。このことから -404~-282 には SSC での発現を抑制する制御領域が存在すると考えられた (図 5)。次に -595~-282 あるいは -497~-282 領域を *SWS1* 上流 0.8 kb をつないだ GFP レポーターと共に受精卵に導入したところ、LSC に発現が誘導された。よって -497~-282 には *SWS2* の LSC での発現を誘導する領域が含まれていた (図 5)。この領域を既知の魚類 *SWS2* ゲノム周辺領域と比較したところ、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) の *SWS2* 直上領域と配列類似性が高いことがわかった。

また -450~-427 の欠失により、本来発現しない脳の光受容器官である松果体と網膜双極細胞で強い発現が見られた (図 4: Deletion)。上流 1.4 kb の GFP コンストラクト中でこの 24 bp の領域に点変異を導入したところ、*SWS2* の松果体での発現抑制には TAACTGCCA の 9 bp からなる新規シス調節エレメントとその直下に存在する既知のシス調節エレメントである OTX 結合配列が共に不可欠であることを明らかにした (図 4: mut-4-6, -8, 図 5)。また *SWS2* の双極細胞での発現抑制にも同一の OTX 結合配列が必

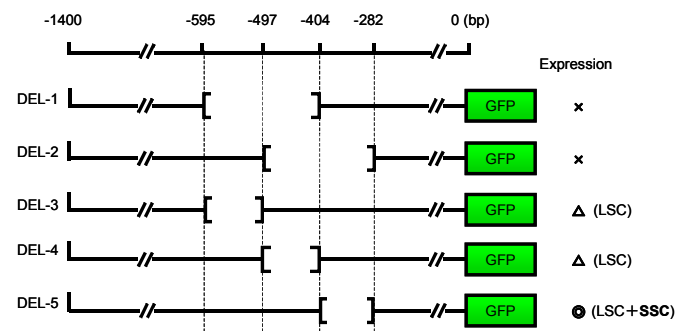


図3 *SWS2* 上流 1.4 kb から -595~-282 領域を欠失したコンストラクトの生体導入実験の結果。◎, △, ×は上流 1.4 kb を用いた時の発現を○とした場合の発現レベルを表す。

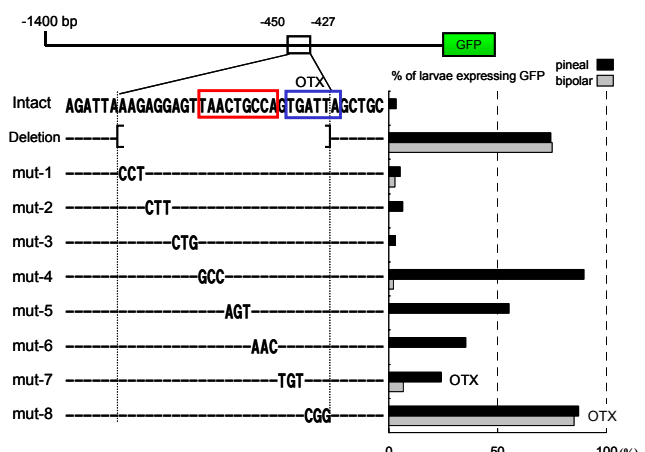


図4 *SWS2* 上流 -450~-427 領域に欠失または点変異を導入したコンストラクトの生体導入実験の結果。

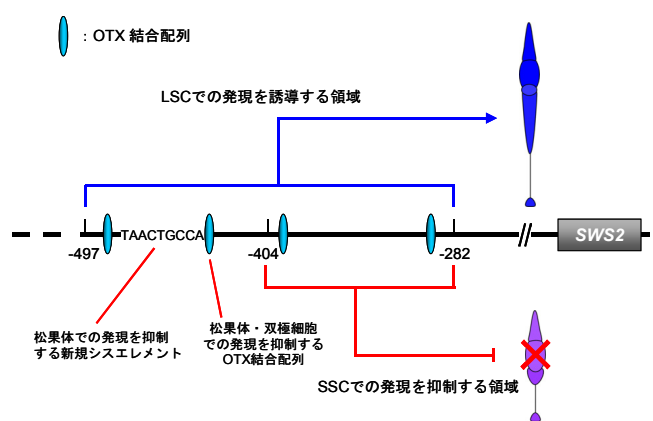


図5 *SWS2* 上流の発現制御領域のまとめ。

要であることがわかった (図 4: mut-8, 図 5)。

③ 紫外タイプ視物質遺伝子 (*SWS1*) の発現制御領域の検討

SWS1 の様々な長さの上流領域を GFP レポーターにつないでゼブラフィッシュ受精卵に導入し、トランスジェニックラインを樹立した (図 6A)。上流 5.5 kb を用いた 2 ラインの GFP は共に網膜全体の SSC に発現し (図 6B)、内在 *SWS1* の時間的空間的な発現パターンと一致することを *in situ* hybridization と免疫組織化学染色によって確認した。一方で上流 1.8 kb と 1.4 kb を用いた 3 ラインは一部の SSC でしか GFP 発現が見られなかった。この結果、*SWS1* の上流 1.8 kb 内には SSC での特異的な発現を誘導する領域が、上流 1.8 kb~5.5kb にはエンハンサー領域がある事がわかった。

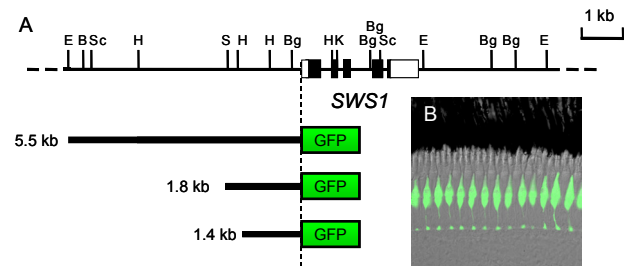


図 6 (A) *SWS1* 上流領域を GFP レポーターにつないで作製したコンストラクト. (B) 上流 5.5 kb を用いて樹立した SSC 可視化トランスジェニックゼブラフィッシュの成魚網膜 発表論文 2 より改変.

【結論】

視物質遺伝子におけるサブタイプの存在は魚類に特徴的に見られるため、陸上とは異なり濁度、深度等により多様に変化する水中の光環境に関与すると考えられているが、その実像と意義は多くが未知であった。本研究ではサブタイプが網膜で異なる空間的な発現パターンを示すことを初めて示し、サブタイプを有する魚類が成長時期や視野によってきめ細かく異なる波長感受性の調節を行っている事を示唆する結果を得た。

青タイプ、紫外線タイプ視物質遺伝子の上流領域を用いて LSC, SSC をそれぞれ可視化した「視細胞可視化ゼブラフィッシュ」を樹立した。これらのラインはすでに国内外の研究者に提供し、視細胞発生が不全となる突然変異体の解析が共同研究として開始している (発表論文 4)。また、青タイプ視物質遺伝子において新規シス調節エレメントを含む複数の発現制御領域を同定したが (図 5)、1 つの視物質遺伝子において網膜と松果体の両光受容器官での発現制御領域を同定したのは初めての報告となる。ゼブラフィッシュや他動物において視物質が松果体でも発現する例が知られており、松果体と網膜における視物質遺伝子の発現制御機構の関連性を考える上で興味深い結果を得た。

【発表論文】

- 1) Hamaoka, T. [†], Takechi, M. [†], Chinen, A., Nishiwaki, Y. and Kawamura, S. (2002). "Visualization of rod photoreceptor development using GFP-transgenic zebrafish" **Genesis**, 34 (3):215-220. [†]Equal contribution
- 2) Takechi, M., Hamaoka, T. and Kawamura, S. (2003). "Fluorescence visualization of ultraviolet-sensitive cone photoreceptor development in living zebrafish" **FEBS Letters**, 553 (1-2):90-94.
- 3) Takechi, M. and Kawamura, S. (2005). "Temporal and spatial changes in the expression pattern of multiple red and green subtype opsin genes during zebrafish development" **The Journal of Experimental Biology**, 208 (7):1337-1345.
- 4) Wei, X., Zou, J., Takechi, M., Kawamura, S., Li, L., "Nok plays an essential role in maintaining the integrity of the outer nuclear layer in the zebrafish Retina" **Experimental Eye Research**, in press (Available online, 10 Mar. 2006)