

紫外線感受新規光受容細胞の細胞分化機構と機能の解明

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 細胞組織学分野

大内 淑代

1. 研究目的

ヒトの眼は光を感じるところからその機能は始まる。光を細胞内シグナルに変換する光受容体は、視物質と呼ばれ、G蛋白質共役型受容体 (GPCR)であるオプシンと発色団レチナールとからなる構造をもつ。現在、オプシンは7つのグループに分類されており、その機能などが研究されてきた。その一つであるオプシン5は、紫外線を感じる新規オプシンであることを我々は発見し、2010年にProc. Natl. Acad. Sci. USA 誌で報告した。特にオプシン5が、網膜だけでなく、脳の神経細胞、特に視床下部ニューロンに存在することを発見した。つまり、脳に新規な「眼」があることがわかり、オプシン5を介する情報が脳の活動に影響を与えることが強く示唆される。本研究では、オプシン5が担う哺乳類脳の「眼」の機能を明らかにするため、オプシン5遺伝子のノックアウト動物を作製し解析する。最終的には、ヒトのオプシン5の機能を推測するために霊長類のノックアウトおよびノックイン動物を作製したい。オプシン5ノックアウト動物の解析を行い、脳の「眼」の機能を解明するのが研究目的である。

2. 方法

(1) オプシン5ノックアウトマウスのTALEN法による作製

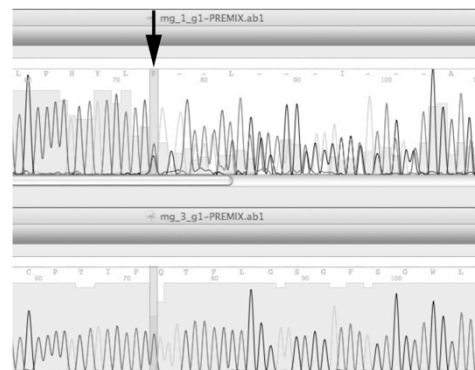
オプシン5のノックアウト動物を作製するために、人工核酸切断酵素 Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN) を用いた。すなわち、オプシン5遺伝子の標的配列を選択し、対応するTALENベクターを構築し、ベクターDNAを精製した。TALENベクターは、フォワードとリバースという2つのDNAからなり、それぞれの転写産物であるmRNAからタンパク質が翻訳されて、2量体を形成して初めて人工核酸切断酵素としてはたらく。このベクターDNA (フォワード、リバース各々) を鋳型にしてメッセンジャーRNA (mRNA)を試験管内合成し、マウス受精卵に顕微注入した。顕微注入後の受精卵を～1日間、体外培養した。正常発生した受精卵のみを、仮親マウスの卵管に移植した。TALEN法によるマウスゲノム編集効率を調べるために、受精卵が10日胚まで成長したところで、仮親マウスを帝王切開した。得られたマウス胚 (n=9) からゲノムDNAを抽出し、オプシン5遺伝子の標的配列を含むゲノム領域をPCRにて増幅させた。この9サンプル (ゲノムDNA断片) をフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈澱により粗精製して、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列解析を行った。

(2) 哺乳類オプシン5の分子特性の解析

我々を含め、世界で複数のグループが哺乳類のオプシン5の研究を行っているが (Kojima D et al., 2011, Nieto PS et al., 2011)、脳における局在やオプシン5蛋白質の詳細な分子特性については明らかにされていない。そこで、脳における分子組織学的解析および、非哺乳類のオプシン5と哺乳類のオプシン5の分子特性の比較を行った。

3. 結果 研究成果

(1) マウス胚番号1,2,6,7,8,9では、右図(上)に示すように、矢印で示した塩基以降がダブルピークを示した。個体番号3,4,5ではダブルピークは見られず、変異が見



られなかった(前頁図下)。すなわち、マウス個体番号1および4～9においてゲノム改変がおこっていることが明らかになった。

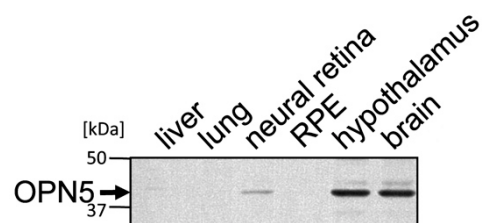
(2) マウス成体脳では、非哺乳類であるトリ脳と異なり、視床下部後部でなく前部視床下部の特定の神経核にオプシン5 mRNA 発現細胞が存在することがわかった。性行動や体温調節に関与する神経核であり、オプシン5 ないしは短波長の光がこれらの生体機能の調節に関与するかどうか、ノックアウトマウスを用いて調べることが期待できる。さらに、コモンマーモセット(京都大学霊長類研究所との共同研究による)の脳においても同様な神経核にオプシン5 が存在することを *in situ hybridization* 法により明らかにした。一方、分子特性の解析では、魚類や鳥類のオプシン5 は、リガンドとして11-シスレチナルとオールトランスレチナルいずれにも結合できるが、マウスやヒトのオプシン5 は桿体・錐体オプシンと同様にオールトランスレチナルに結合できないことがわかった。そこで、非哺乳類と哺乳類のオプシン5 のアミノ酸配列の比較したところ、通常、レチナルが結合するオプシン蛋白質構造近傍の単一アミノ酸が、両者で異なることに気がついた。さらに、試験管内人工変異法により非哺乳類オプシン5 の該当するアミノ酸を哺乳類のオプシン5 のものに変異させると、オールトランスレチナルへの結合能を失った。このことを支持するように、マウス・サル脳ではオプシン5 発現細胞の近傍に11-シスレチナル供給に関わる酵素である RPE65 が遺伝子発現していたが、トリ脳では RPE65 の発現が、眼の色素上皮以外に脳に観察されたが、オプシン5 発現細胞より離れて存在していた。

4. 考察 まとめ

(1) 胚の段階でのゲノム編集効率を調べることで、TALEN 技術により約60%の高効率でマウス個体レベルの変異をおこすことができることが分かった。現在、同じシステムでオプシン5 ノックアウト成体マウスを作製しようとしている。本研究では、GFP ノックインによるオプシン5 発現細胞の発生・分化メカニズムの解明をも目的とした。最近、新しいゲノム編集法である CRISPR 法(クリスパー)が発見された。これは、細菌の免疫機能に関わるシステムで、標的 DNA 配列の認識は相補的配列をもつガイド RNA が行い、DNA 切断は Cas9 という RNA との結合能をもつ酵素が行う。TALEN は TALE 部分の遺伝子ベクター構築に熟練と時間がかかるものであるが、CRISPR 法であると、標的 DNA の配列さえ設計すれば、それに対する相補的 DNA を人工合成し、RNA 合成用のベクターにクローニングするだけでよい。また、CRISPR 法は、ゲノム編集効率が TALE の10倍以上とも言われ、レポーター遺伝子のような長い遺伝子断片を挿入することが可能、すなわちノックインも高効率で行えることが米国のグループよりすでに報告された(2013年9月)。そこで、オプシン5 発現細胞の GFP ノックインによる標識は CRISPR 法を用いて行う予定である。

(2) 単一アミノ酸の変化により、哺乳類オプシン5 ではオールトランスレチナルへの結合能を失っており、11 シスレチナルを他の細胞から供給されていることがわかった。タンパク質レベルでもオプシン5 が存在していることは、免疫プロット法では証明できた(右図)が、現在の抗体では免疫組織化学的に示すことが困難であり、オプシン5 遺伝子座への GFP などのレポーターノックイン法を早急に行うことが必要である。

(本研究は、徳島大学、理化学研究所発生・再生科学総合研究センター、京都大学、京都府立医科大学との共同研究で得られた成果の一部である。)



5. 発表論文、参考文献

(1) Molecular aspects of eye evolution and development: from the origin of retinal cells to the future of regenerative medicine. Ohuchi H. Acta Med Okayama (2013) 67: 203-212.

(2) Evolution of mammalian Opn5 as a specialized UV-absorbing pigment by a single amino acid mutation. *Yamashita T, *Ono K, Ohuchi H, Yumoto A, Gotoh H, Tomonari S, Sakai K, Fujita H, Imamoto Y, Noji S, Nakamura K, Shichida Y. J Biol Chem, revising. *Equally contributed.