

研究題目：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

先端生命科学専攻 学籍番号：46549 細谷 知広 2006年3月修了 指導教官：河村 正二 助教授

キーワード：色覚、オプシン、遺伝子重複、転写調節機構、ゼブラフィッシュ

【背景と目的】

色覚は、採食行動、繁殖行動、捕食者の識別など、生物の生存に関わる重要な感覚であり、その機能は生物の生態と密接に関わりながら進化してきたと考えられる。脊椎動物の色覚の成立には、視細胞中の光受容分子である視物質が重要な役割を果たしている。この視物質には、遺伝子重複とアミノ酸置換によって生じた光吸収特性の異なるレポーターが存在し、進化系統学的に、桿体型 (RH1) 緑型 (RH2) 紫外線型 (SWS1) 青型 (SWS2) 赤型 (M/LWS) の5種のグループに分類される。色覚が成立するためには、これらの異なる光吸収特性をもつ視物質を複数有し、さらにそれらを異なる視細胞で特異的に発現させることが必要不可欠である。しかし、この1視細胞1視物質遺伝子という発現制御機構については、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、魚類は高度な色覚系を備えている。これは、水中の光環境が、濁度や深度といった陸上にはない要因の存在によって多様であり、それに適応した結果だと考えられている。魚類は一般的に、5グループ全ての視物質遺伝子をもち、それらを視細胞特異的に発現している。また、興味深いことに、魚類の各視物質遺伝子のグループは、遺伝子重複により生じたサブタイプをもつことがある。発生遺伝学的に優れたモデル動物であるゼブラフィッシュは、1種類の桿体型 (RH1) 紫外線型 (SWS1) 青型 (SWS2) 2種類の赤型 (LWS-1, -2) 4種類の緑型 (RH2-1, -2, -3, -4) の9種類の視物質遺伝子をもち (図1)、これら全てが成魚で発現していることが分かっている。

2種類の赤型 (LWS-1, -2) と4種類の緑型 (RH2-1, -2, -3, -4) 視物質遺伝子は、サブタイプ間で光吸収特性が異なり、また、網膜中の発現領域も時間的・空間的に異なっている (図2)。このような視物質遺伝子のサブタイプ間の機能分化は、魚類の生息環境と密接に関係していると考えられる。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, -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。

【結果】

GFP発現PACコンストラクトの発現誘導能の解析

ゼブラフィッシュ赤型視物質遺伝子 (LWS-1, -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した。LWS遺伝子に関しては、これまでの研究により、上流領域だけでは発現誘導を行えないことが分かって

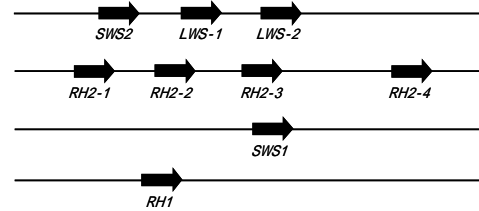


図1. ゼブラフィッシュ全視物質遺伝子のゲノム構造. LWS遺伝子には2つ、RH2遺伝子には4つのサブタイプ遺伝子が存在する。

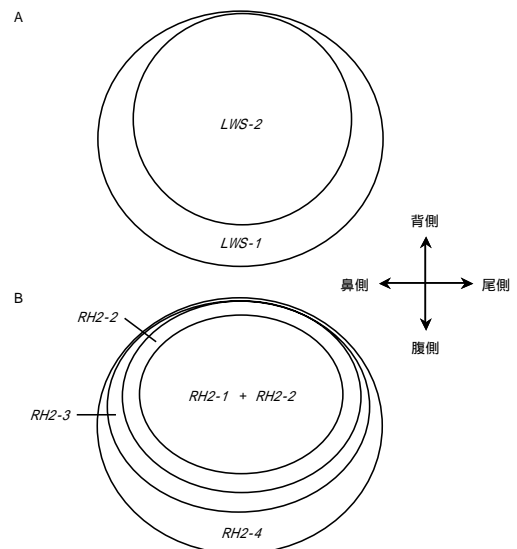


図2. ゼブラフィッシュ成魚網膜におけるRH2およびLWSサブタイプ遺伝子の発現分布. (A) LWS遺伝子. (B) RH2遺伝子.

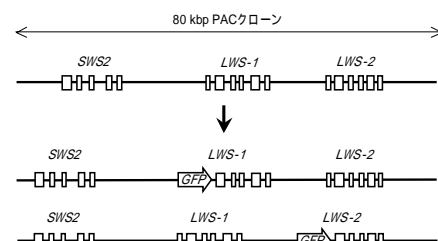


図3. GFP発現PACコンストラクトの作製. PACクローン中のLWS-1, LWS-2それぞれのエキソン1を独立にGFP遺伝子に置換した。

いた。そこで当研究室では、*SWS2*と2つの*LWS*遺伝子である*LWS-1*と*LWS-2*の両方を含む全長約80 kbのPACクローンをを用いた発現制御機構の解析が行われた。同一PACクローン中の*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が作製され、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された。その結果、松果体及び眼球でGFPとDsRedの発現が見られ、*LWS-1*と*LWS-2*が松果体と眼球で発現していることが分かった。しかし、*LWS-1*と置換したGFPの蛍光はDsRedの蛍光に比べて非常に弱く、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があった。そこで、本研究では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のかを検証した(図3)。その結果、*LWS-2*をGFP遺伝子に置換したコンストラクトでは、網膜および松果体でのGFPの発現を確認できたが、*LWS-1*をGFP遺伝子に置換したコンストラクトでは、網膜でのGFP発現はなく、松果体のみでGFPの発現が見られる個体が低頻度で確認できただけだった。*LWS-2*のコンストラクトにおいて、網膜中でGFPを発現している細胞は、*LWS*遺伝子が本来発現する視細胞であるLDC (long members of double cone)であることを確認した。以上のことより、*LWS-2*に関しては、PACクローン中にLDC特異的な発現制御領域が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、PACクローン中に*LWS-1*の発現制御領域が含まれておらず、PACクローンに含まれていない領域に*LWS-1*の発現制御領域が存在する可能性が示唆された。

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、PACクローン中の*LWS-2*をGFP遺伝子に置換したコンストラクトのマイクロインジェクション結果により、PACクローン中に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PACコンストラクト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った。その結果、*LWS-1*の上流領域(2.6 kb)と*LWS-2*の上流領域(1.8 kb)を含むコンストラクトでは網膜においてGFP発現が確認できたが、*LWS-2*の上流領域(1.8 kb)のみを含むコンストラクトでは網膜においてGFP発現を確認することはできなかった(図4)。このことから、*LWS-1*の上流領域に*LWS-2*の発現制御領域が存在することが示された。

*LWS-1*上流領域における*LWS-2*の発現制御領域の探索

*LWS-1*上流領域における*LWS-2*の発現制御領域の絞込みを行うために、*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網膜にGFP発現が見られないコンストラクトと、*LWS-1*上流領域を様々な領域に区切ったDNA断片とのco-injectionを行った。その結果、co-injectionに*LWS-1*上流1.3 kbから0.6 kbの領域のDNA断片を用いた場合に、網膜でのGFP発現を確認した(図5)。このことから、*LWS-1*上流1.3 kbから0.6 kbの領域に*LWS-2*の発現制御領域が含まれており、*LWS-2*の発現にはこの領域と*LWS-2*の上流領域(1.8 kb)の両方が必要であることが示された。

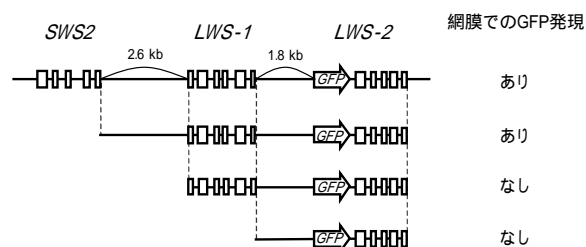


図4. GFP発現コンストラクトによる*LWS-2*の発現制御領域の探索

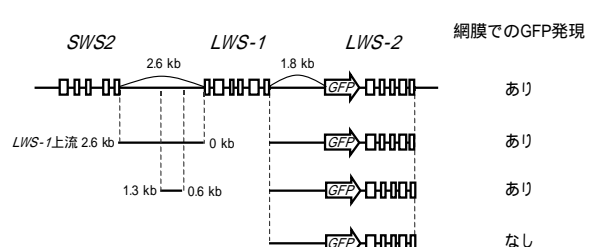


図5. *LWS-1*上流領域における*LWS-2*の発現制御領域の探索

【考察】

本研究により、*LWS-2*がサブタイプである*LWS-1*の上流領域(上流1.3 kbから0.6 kbの領域)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、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。