

ゲノム編集によるメダカ TRP の機能解明

— TRPV1b ノックアウトメダカ作成の試み —

浅野 麻己子¹・竹花 佑介^{1,2}・齊藤 修^{1,2}

¹長浜バイオ大学大学院・バイオサイエンス研究科

²長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

要旨

メダカの主要な侵害センサーと考えられる TRPV1b (oITRPV1b) をクローニングし機能解析を行った結果、カプサイシン応答性はなく、酸と 2-APB に応答した。また、低温と 25°C 以上の高温で緩徐に活性化された。更に oITRPV1b には浸透圧応答性があり、高張液により活性化された。そこで本研究では、この多機能の oITRPV1b がメダカ生体内でどのような機能に関わっているのかを知る為、oITRPV1b を発現しないメダカを樹立することにした。oITRPV1b 遺伝子の転写開始点直下に sgRNA を設計し、CRISPR/Cas9 系を用いて GFP 発現ユニットを挿入するノックインメダカ、oITRPV1b 遺伝子のアンキリンリピートドメインと膜貫通領域の間に sgRNA を設計し、膜貫通部のない不完全なタンパクを発現するノックアウトメダカの作出を試みた。

1. はじめに

細胞の環境応答センサーとして働く Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルのうち、特に皮膚・感覚神経に発現し、生存環境からの侵害刺激の主要センサーとして機能するのが、温度感受性を持つ 6 種の TRP チャンネル (温度感受性 TRP (thermoTRP): TRPA1, TRPV1-4, TRPM8) である。哺乳類のマウスのそれら温度感受性 TRP を活性化する温度閾値はチャンネルごとに異なっており、広い温度域がカバーされていることが知られている (図 1)¹⁾。また、それらの TRP は、温度以外にも化学物質や多数の刺激によって活性化され、多刺激受容センサーとして機能している。一方、これまでに複数の動物種の温度感受性 TRP の解析から、温度閾値や化学物質応答性が動物種間で明らかに異なることが報告されてきた^{1), 2)}。おそらく生物多様性を支える機構の一つと予想されたが、これまでの TRP 研究は陸上動物を対象にしたものが多く、大きく生存環境が異なる水中に生息する魚類の TRP 群の機能の詳細は明らかになっていなかった。

一方、魚類のゲノム解析が進められ、特にその中に前述の温度感受性 TRP を探すと、陸上動物とは異なり低温を担当する TRPM8、最も高温を担当し浸透圧感受性を持つ TRPV2、温かい温度を認識する

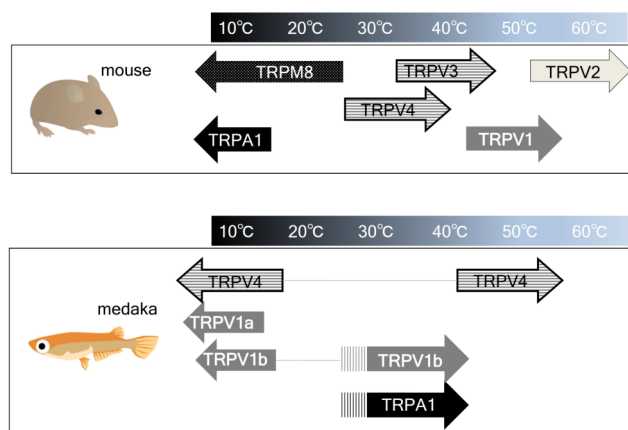


図 1 マウスとメダカの温度感受性 TRP

TRPV3 の遺伝子がなく、主要な感覚 TRP は TRPA1,V1,V4 で、魚類は 3 種の少ない TRP レパートリーで外界シグナルを受容していると考えられた^{1), 3)}。また、魚類の特徴としてゲノム倍化に由来し、ゼブラフィッシュ(z)では TRPA1 が 2 分子(TRPA1a, TRPA1b)、メダカ(ol)とフグでは TRPV1 が 2 分子(TRPV1a, TRPV1b)存在する^{1), 3)}。そこで我々は、魚類がこれらの特徴的な感覚 TRP を使ってどのように温度などの外界環境を感知しているか、各センサーの機能特性を調べ始めた。結果、極めて興味深い新しい知見が得られた。我々のメダカの解析結果を図 1 にまとめた。1) TRPM8 以外の TRP が低温応答性を獲得しており、他の動物種にはない両温応答性 TRP が存在する。2)魚類 TRPA1 と V1 は、陸上動物のように明確な高温活性化閾値はなく 25°C程度から徐々に高温活性化される特性を持ち、温度係数(Q10)も低い^{4), 5), 6)}。3)まだ確認実験が必要だが、魚類 TRPV4 は、陸上動物とは異なり高温域を担当し閾値 40°Cから活性化される。つまり魚類には中温域 (20°C-30°C) に閾値センサーはない。また、魚類特有のパラログ間(zTRPA1a,b; olTRPV1a,b)では機能分化があることが発見された⁴⁾。特にメダカの 2 分子種の TRPV1(olTRPV1a,b)は、極めて興味深い。即ち、フグの 2 分子種の pTRPV1a と pTRPV1b とは、配列上 a 同士、更に b 同士はかなり類似している。一方、1 分子種しかないゼブラフィッシュの zTRPV1 は、b に近い。発現も olTRPV1b の方が全身で高いことから、メダカの主要な侵害センサーとして働くのはこの olTRPV1b と考えられ、カエル卵母細胞発現系を用いた詳しい機能解析を行った。結果、メダカの主要な TRPV1 に当たる olTRPV1b には、哺乳類 TRPV1 のようなカプサイシン応答性はないが、酸や 2-aminoethoxydiphenylborane (2-APB)には応答性があった。また、温度刺激に対しては両温応答性で、低温 (閾値約 9°C) と 25°C以上の高温で緩徐に活性化された。一方、哺乳類の N 端欠失 TRPV1 変異体(Δ N-TRPV1)や TRPV2 では、浸透圧あるいは機械刺激による活性化が知られているが^{7), 8), 9)}、olTRPV1b にも浸透圧応答性が検出され、高張液により活性化された。そこでこの olTRPV1b が生体内でどのような機能に関わっているか、CRISPER/Cas9 の実験系で olTRPV1b を発現しないメダカを樹立して明らかにすることにした。

2. olTRPV1b の代わりに GFP を発現するノックインメダカ作出の試み

olTRPV1b 遺伝子の転写開始点と翻訳開始点の間に sgRNA(GFP1,2)を設計し (図 2)、 CRISPR/Cas9 を用いて GFP 発現ユニットを挿入した。これにより、olTRPV1b 遺伝子上流に GFP が挿入され、olTRPV1b を発現する細胞で

olTRPV1b の代わりに GFP が発現し蛍光が検出されることが期待される。メダカ受精卵に injection した後 3 日目~7 日目の間に GFP を発現している F0 胚を蛍光顕微鏡で観察し、sgRNA GFP1 では 26 匹、sgRNA GFP2 では 17 匹の GFP を発現する F0 胚が得られた。これらの中で成体まで生き残った F0 を野生型と交配させ、

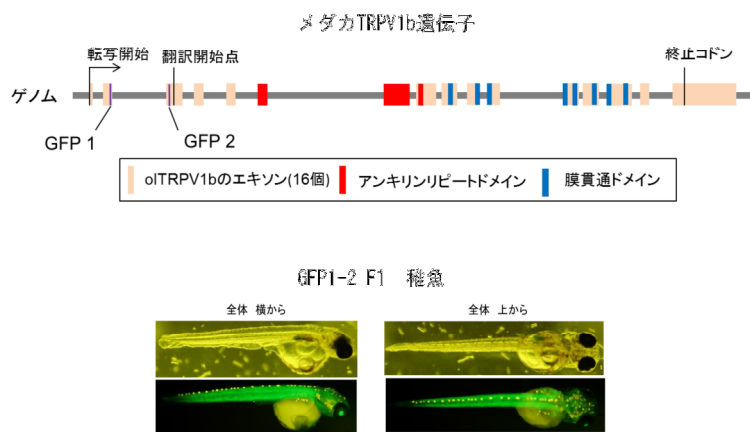


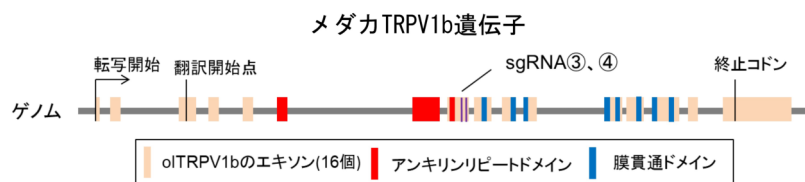
図 2 GFP ノックインメダカ作出用の sgRNA ターゲット部位と GFP 発現メダカ

その産子の GFP を発現する F1 で蛍光分布を解析した。特に GFP1 由来で発現個体が多くみられ、体全体に濃淡の少ない蛍光が検出された。図 2 にその F1 の例 (GFP1-2) を示した。よって、olTRPV1b はメダカの全身に広く発現していることが示唆された。しかし、olTRPV1b 遺伝子内に GFP 遺伝子が挿入されているかを、GFP 発現稚魚のゲノム DNA を用いて PCR で解析した結果、バンドが確認できなかった。即ち、GFP は olTRPV1b 遺伝子上の目的の場所に挿入されていないことが判明した。そのため、今後は sgRNA のみ injection を行い変異の導入効率を確認し効率が悪い場合は設計し直す必要がある。又、共同研究で行ったメダカの胚を用いた olTRPV1b の *in situ* hybridization の結果では側線神経、脊椎骨付近に陽性反応が見られている。よって、GFP 蛍光がこの結果と同様なパターンを示す F0 個体を用いて F1 を作成し、再度研究を進める必要がある。

3. olTRPV1b のノックアウトメダカ作出の試み

olTRPV1b をノックアウトするためのガイド RNA の olTRPV1b sgRNA3 と sgRNA4 を、olTRPV1b 遺伝子のアンキリンリピートドメインと膜貫通領域の間のリンカー領域をコードするエキソン部分に設計した (図 3)。メダカ受精卵に Injection 後 5 日目または 7 日目に、生存数と変異導入の効率を確認した。この F0 における変異導入の検出は、Injection した受精卵からゲノム DNA を調製し、ガイド RNA を囲む形で設計したプライマーセットを用いて PCR を行い、ヘテロ二本鎖移動度分析により行った。図 3 に示したように、sgRNA3 では最初に Injection したグループ (#1) は変異導入率が高かったが生存率が低く、2 回目および 3 回目に Injection したグループ (#2 と #3) では生存率は高かったが変異導入率が低かった。そのため生存率が高く変異導入率が高い sgRNA4 を選択し、olTRPV1b ノックアウトメダカの作出を進めた。

sgRNA4 F0 と野生型を交配させた F1 胚を 1 ペアあたり 8 個サンプリングし、PCR で F1 での変異の頻度を確認した。変異が受け継がれていた場合 F1 はヘテロのため、野生型由来と変異由来のバンドの複数が増幅される。sgRNA4-1、2、3 の 3 ペアからサンプリングした F1 胚では複数のバンドが得られた。特に sgRNA4-2 と 4-3 のペアの子孫について更に研究を進めた。



	インジェクション数	生き残った個体数 (受精からの期間、生存率)	変異導入率
sgRNA3 #1	47	4(5日、9%)	100%
sgRNA3 #2	35	22(7日、63%)	25%
sgRNA3 #3	54	52(7日、96%)	25%
sgRNA4	23	22(7日、96%)	100%

図 3 ノックアウトメダカ作出用の sgRNA ターゲット部位と変異導入効率

sgRNA4-2,3 F1 の尾ビレから DNA を抽出し、PCR 及びシーケンスによりフレームシフトを誘発するような配列が確認した。sgRNA4-2 F1 では PCR を行った 25 匹中、フレームシフトを誘発する変異で

ある (del 2 /+) が 13 匹、(ins 10 /+) が 1 匹得られた。そのため、F2 世代で del 2 のホモの個体を得るために、(del 2 /+) 同士を交配した。sgRNA4-3 F1 では PCR を行った 13 匹中、フレームシフトを誘発する変異である (del 62 /+) が 5 匹、(ins 5 /+) が 5 匹、(del 11 ins 3 /+) が 2 匹得られた。そのため、F2 世代で del 62 のホモの個体を得るために、(del 62 /+) 同士を交配した。最終的にそれぞれ複数のホモ個体を得ることに成功し、2 系統の TRPV1b ノックアウトメダカを樹立することができた。2 塩基欠失と 62 塩基欠失の配列をアミノ酸に翻訳すると、どちらもフレームシフトにより図 4 に示すアンキリンリピート以降不完全な TRPV1b タンパク質となる。今後、このノックアウトメダカがどのような刺激応答性を示すか解析を進めていく。

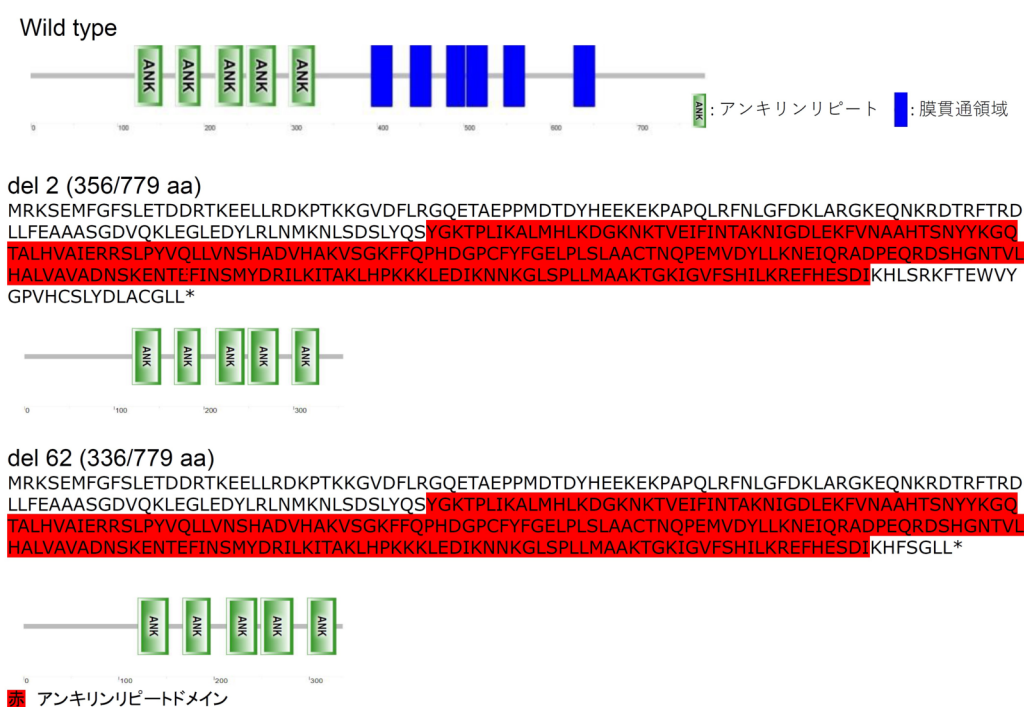


図 4 ノックアウトメダカに発現する TRPV1b 変異体タンパク

参考文献

- 1) Saito S, Tominaga M., Functional diversity and evolutionary dynamics of thermoTRP channels., **Cell Calcium**. 57, 214-221, (2015)
- 2) Saito S, Tominaga M., Evolutionary tuning of TRPA1 and TRPV1 thermal and chemical sensitivity in vertebrates., **Temperature** (Austin, Tex.). 4, 141-152. (2017)
- 3) Saito S, Shingai R., Evolution of thermoTRP ion channel homologs in vertebrates., **Physiol Genomics**. 27, 219-230, (2006)
- 4) Oda M, Kurogi M, Kubo Y, Saitoh, O., Sensitivities of two zebrafish TRPA1 paralogs to chemical and thermal stimuli analyzed in heterologous expression systems. **Chem Senses**. 41, 261-272, (2016)
- 5) Oda M, Saito K, Hatta S, Kubo Y, and Saitoh O., Chemical and thermal Sensitivity of medaka TRPA1 analyzed in heterologous expression systems. **Biochem Biophys Res Comm**. 494, 194-201, (2017)

- 6) Oda M, Kubo Y, Saitoh O., Sensitivity of Takifugu TRPA1 to thermal stimulations analyzed in oocyte expression system. **Neuroreport.** 29, 280-285, (2018)
- 7) Zaelzer C, Hua P, Prager-Khoutorsky M, Ciura S, Voisin DL, Liedtke W, Bourque CW., Δ N-TRPV1: A molecular co-detector of body temperature and Osmotic stress. **Cell Report.** 13, 23-30, (2015)
- 8) Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y., TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. **Circ Res.** 93, 829-828, (2003)
- 9) Mihara H, Boudaka A, Shibasaki K, Yamanaka A, Sugiyama T, Tominaga M., Involvement of TRPV2 activation in intestinal movement through nitric oxide production in mice. **J Neurosci.** 30, 16536-16544, (2010)

謝辞

本研究は、長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・アニマルバイオサイエンス学科の動物分子生物研究室及び発生遺伝学研究室の多くの方々の協力の下に行われた。

また、本研究には、「組換えDNA実験」に該当する実験が含まれているが、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」及び「長浜バイオ大学遺伝子組換え生物等の使用等にあたっての安全管理に関する規則」を遵守し、本学遺伝子組換え実験委員会の承認を受けた実験計画の下で行われたものである。