

# ゲノム編集によるメダカ TRP の機能解明 — TRPV4 ノックアウトメダカ作成の試み —

## Generation of *trpv4*<sup>-/-</sup> medaka by CRISPR/Cas9

堀 翔悟<sup>1</sup>・竹花 佑介<sup>1,2</sup>・齊藤 修<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>長浜バイオ大学大学院・バイオサイエンス研究科

<sup>2</sup>長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

Shogo Hori<sup>1</sup>, Yusuke Takehana<sup>1,2</sup>, Osamu Saitoh<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

<sup>2</sup>Genome Editing Research Institute, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

### 要旨

温度感受性 Transient Receptor Potential (TRP) に分類される TRPV4 をメダカから cDNA クローニングし、機能解析を行った。結果、代表的な TRPV4 リンドだけでなく、2-APB にも応答した。また、温度応答性は四肢動物と異なり、低温と 40°C 以上の高温で活性化された。更に浸透圧応答性については、メダカ TRPV1 とは逆に低張液により活性化された。そこで本研究では、この多機能のメダカ TRPV4 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、この分子を発現しないメダカを樹立することにした。*oltrpv4* 遺伝子の第 1 膜貫通部と第 2 膜貫通部の間の第 1 細胞外ループをコードするエクソンに sgRNA を設計し、膜貫通部の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。

In order to investigate roles of TRPV4 in the osmoregulation and the mechanism of adaptation to varying salinity of medaka, we generated *trpv4*<sup>-/-</sup> medaka by CRISPR/Cas9 after the functional study of medaka TRPV4 by using heterologous expression system. The Cas9 mRNA and sgRNA for *trpv4* gene were injected into medaka embryo and mutations were validated by observation and sequencing targeted locus. We obtained mutant medaka whose open reading frame of *trpv4* was shifted near the targeted locus.

### 1. はじめに

細胞の環境応答センサーとして働く TRP チャネルは、非選択的陽イオンチャネルで、7つのサブファミリーからなる。その内 11 種が温度刺激に感受性があり、様々な温度範囲で活性化されることが知られ、温度感受性 TRP (thermoTRP) と呼ばれている。その一つ TRPV4 は、哺乳類では非侵害性の 27°C 以上の暖かい温度で活性化される<sup>1), 2), 3)</sup>。

TRPV4 は、もともとげっ歯類などから浸透圧感受性のチャネルとして発見され、HEK293 や CHO などの細胞に発現させると低浸透圧感受性を獲得することが示された分子である<sup>4), 5)</sup>。この TRPV4 は

同時に機械刺激にも応答することから、TRPV4の低浸透圧応答は、浸透圧差で起こる細胞外形の変化に伴う機械刺激受容の例として考えるのが有力である。一方、*trpv4*<sup>-/-</sup>マウスを用いた *in vivo* 実験では、高浸透圧状態の調節機能が破たんしていることが報告された。即ち、*trpv4*<sup>-/-</sup>マウスでは通常状態、更に脱水時に飲水量が減少し血漿浸透圧が上昇しており、バソプレシン分泌が減少していることが示された<sup>6)</sup>。よって、TRPV4はほ乳類において中枢の浸透圧センサーとして働いていると考えられるが、細胞発現系でみられた機能と *in vivo* 実験の解析結果は必ずしも一致していない。

一般に真骨魚類では、体温こそ環境温度に強く影響されるが、体液浸透圧は、淡水魚・海水魚を問わず海水の1/3に相当する300 mOsm/kg程度の一定に調節されている。これは、淡水あるいは海水と大きく体液と異なる水環境でも、鰓・腸・腎臓といった浸透圧調節器官が内分泌系の制御の下、協調的に働き体液の浸透圧恒常性が維持されているからで、多数の報告があった。しかし、その内分泌系自体を制御する上で最も重要な体内の浸透圧モニタリングがどのようにして行われているのかは、近年まで殆ど解明されていなかった。分子生物学的手法の発展とほ乳類TRP研究の進展から、まず魚類での浸透圧センサーの候補として、TRPV4がヨーロッパシーバス<sup>7)</sup>とモザンビークティラピア<sup>8)、9)</sup>から同定され、研究が進められた。特に後者においては、CHO発現細胞での低浸透圧応答性と脳下垂体の前葉端部での発現が確認された。下垂体前葉端部の95%以上が淡水適応ホルモンであるプロラクチン(PRL)分泌細胞であることから、単離PRL細胞を用いてその浸透圧応答性とPRL分泌が解析された。そして、PRL細胞がTRPV4を介して低浸透圧を感知して、それがトリガーになってPRL分泌が起こる機能が強く示唆された。

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TRPVファミリー(V1,V2,V3,V4)を探すと、陸上動物とは異なり最も高温を担当する*trpv2*、温かい温度を認識する*trpv3*の遺伝子がなく、主要な温度感覚TRPは残りの2種だけで、魚類は少ない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<sup>10)</sup>。では、魚類TRPV4はどのような特性をもったイオンチャンネルなのか、その詳細な生理機能は殆ど調べられていない。また、魚類の生体内でTRPV4がどのような働きを担っているのか、本当に体内浸透圧調節に関わっているのかを明らかにするには、そのノックアウト個体を作成する必要があると考えた。そこで、本研究では、メダカからTRPV4 cDNAをクローニングして、電気生理解析で種々の刺激感受性を明らかにして、次いでCRISPER/Cas9の実験系でTRPV4を発現しないメダカを樹立して、個体レベルの生理機能解明を進めることにした。

メダカは、アジアに限定して分布し、それらの地域で主に淡水、稀には汽水にも生息している。このメダカは、高い海水への順応性(耐塩性)を持つことが知られており、メダカを直接海水に入れると死亡するが、1/2海水で24時間順化後は海水で生育可能になる<sup>11)、12)</sup>。よってメダカは、様々な塩類環境における魚類の浸透圧センシングと順応の仕組み、更にTRPチャンネルの関りを研究する有用なモデルである。

## 2. メダカTRPV4のcDNAの単離と生理機能解析

ゲノム情報から予想されていたメダカTRPV4の塩基配列からプライマーを合成し、メダカから調製したRNAを用いて、逆転写PCRによりTRPV4の発現を確認した。結果、期待されたTRPV4配列の増幅が確認できた。そこで、この増幅配列を基にRACEにより全長の配列情報を取得した。結果、単離cDNAは、871アミノ酸からなるタンパク質をコードし、コードタンパク質は既知のTRPV4に高い

同一性（68%-72%）を示した。次に生理機能解析を進める為、カエル細胞内で高い発現を導く pGEMHE ベクターにメダカ TRPV4 cDNA を組み込んだ。そして、この作成したコンストラクトを用いてメダカ TRPV4 の RNA を合成し、これをカエル卵母細胞に注入・発現させ、様々な刺激にตอบสนองするか電気生理解析を行った。結果、表 1 に示すように、代表的 TRPV4 の活性化剤である GSK1016790A

	GSK	Acid	2-APB	温度	低浸透圧
<b>Rat TRPV4</b>	○	○	×	>27°C	○
<b>Medaka TRPV4</b>	○	○	○	>40°C <13°C	○

表 1 ラットとメダカの TRPV4 の刺激応答性

と酸だけでなく、TRPV1-3 の活性化剤である 2-APB にも応答した。また温度応答については、27°C 以上の非侵害性の温かい温度で活性化される Rat の TRPV4 と対照的に、メダカ TRPV4 は、13°C 以下の低温、更に 40°C 以上の高温で活性化され、かなり侵害的温度のみに応答した。更に、メダカ TRPV4 には、明らかな低浸透圧刺激への応答が検出された<sup>1,3)</sup>。

### 3. TRPV4 のノックアウトメダカ作出の試み

本研究では、次に前述の多機能のメダカ TRPV4 がメダカ生体内でどのような機能に関わっているのか、体内浸透圧調節に関わっているのかどうかを明らかにする為、この分子を発現しないメダカを樹

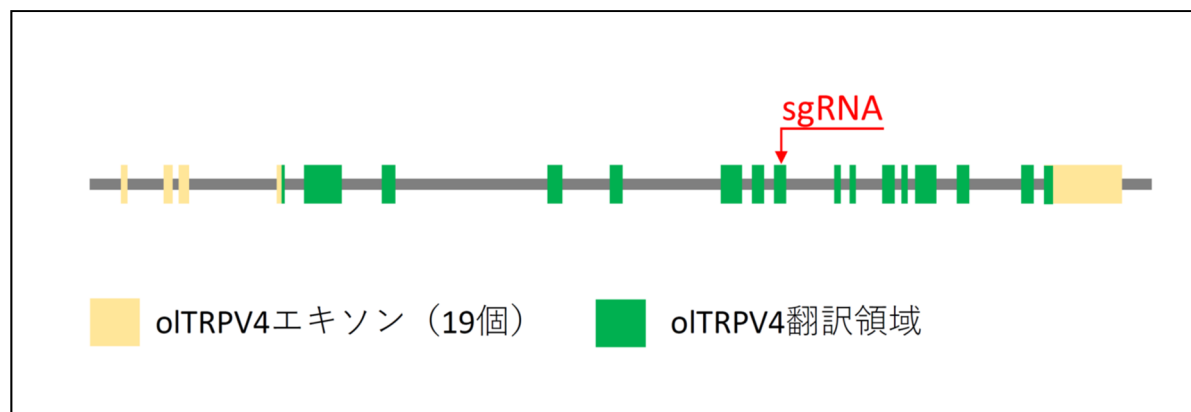


図 1 メダカ *trpv4* 遺伝子の構造と sgRNA

立することにした。*trpv4* 遺伝子は、メダカの 9 番染色体上に存在し 19 個のエキソンから構成されている。TRPV4 タンパクのチャネルを形成する部位に当たる 6 回膜貫通部の第 1 膜貫通部と第 2 膜貫通部の間の第 1 細胞外ループをコードするエキソン 11 に sgRNA を設計した (図 1)。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 した受精卵の複数個からゲノム 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。殆どの卵で変異導入が確認

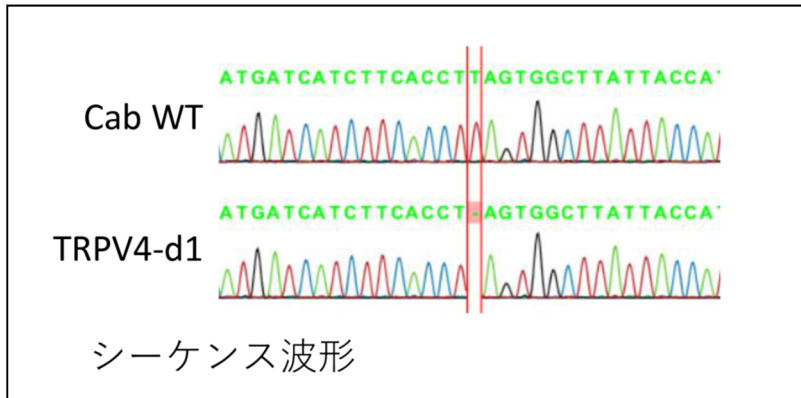


図2 メダカ *trpv4* 遺伝子のエキソン 11 の配列比較

されたので、残りの Injection 卵を育て、野生型メダカとかけ合わせ F1 個体を得た。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変異が導入されているか確認した。結果、フレームシフトを誘発する変異をヘテロに持つ (del 1 /+)

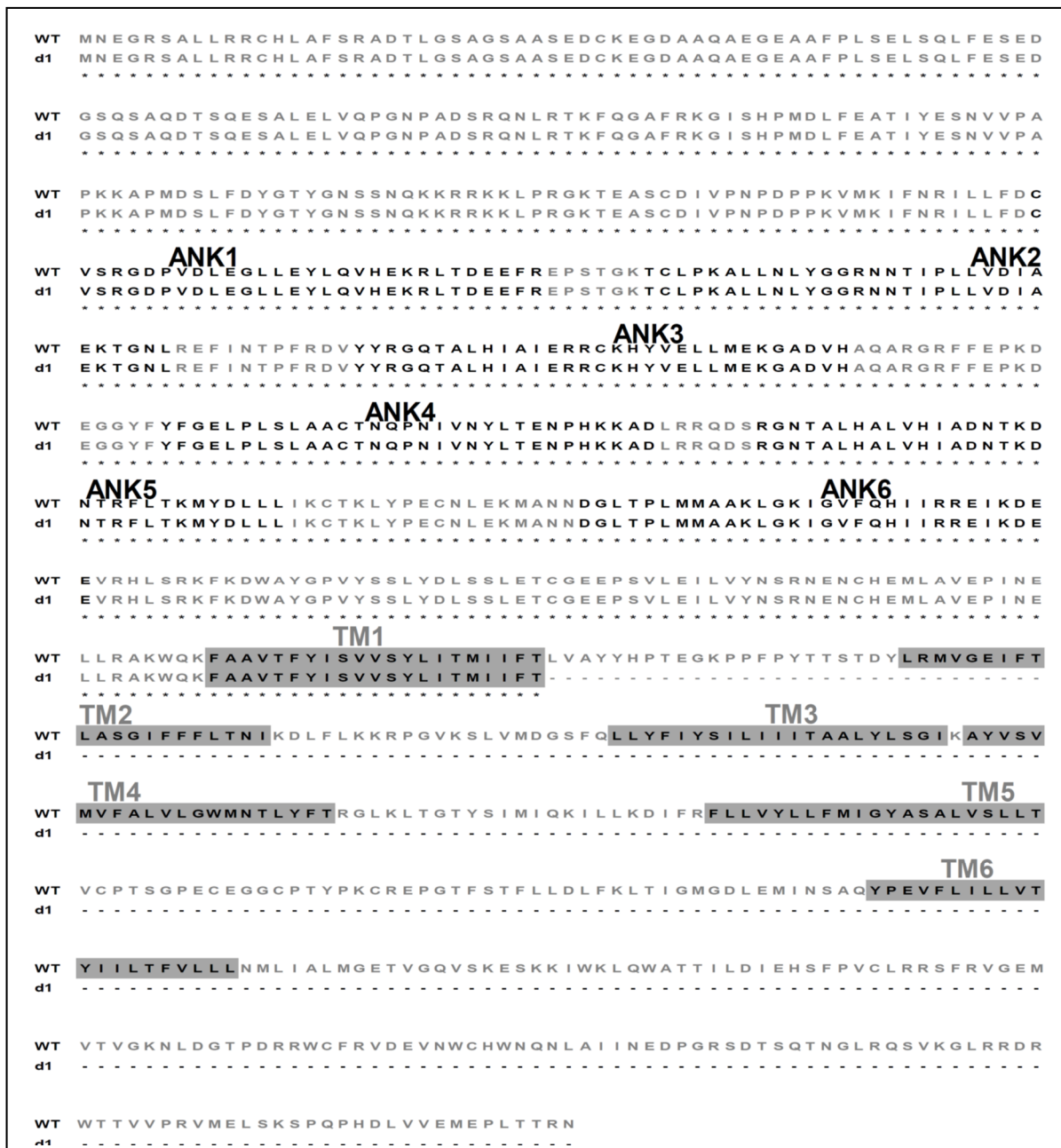


図3 メダカ TRPV4 タンパクと変異体タンパク (ANK:アンキリンリピート、TM:膜貫通部)

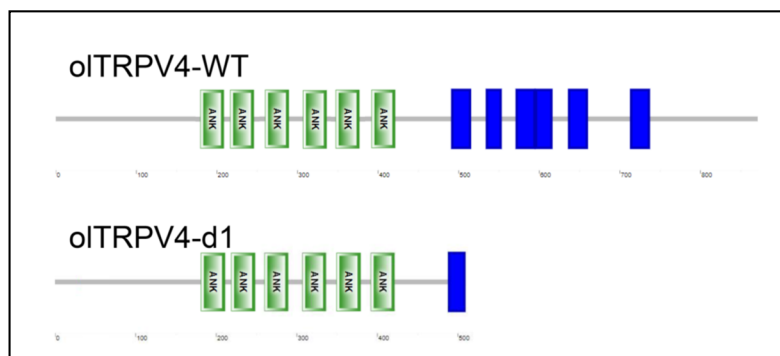


図4 メダカ TRPV4 タンパクと変異体タンパクの構造

示す第一膜貫通部以降不完全な TRPV4 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、またこのノックアウトメダカを用いて TRPV4 が様々な塩類環境におけるメダカの浸透圧センシングと塩水順応に如何に関わっているか解析を進めていきたい。

のオス・メスが得られた。そこで、F2 世代でこの変異のホモ個体を得るために、(del 1 / +) 同士を交配した。最終的に、図 2 に示す様に (del 1 / del 1) のメダカ個体を得ることに成功し、1 系統の TRPV4 ノックアウトメダカを樹立することができた。この 1 塩基欠失の配列をアミノ酸に翻訳すると、フレームシフトにより図 3, 4 に

## 参考文献

- 1) Güler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., Caterina, M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. **J. Neurosci.** 22, 6408-6414, (2002)
- 2) Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S. H., Benham, C. D., Droogmans, G., Nilius, B. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in HEK293 cells expression system and in native mouse aorta endothelial cells. **J. Biol. Chem.** 277, 47044-47051, (2002)
- 3) Chung, M.-K., Lee, H., and Caterina, J. M. Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. **J. Biol. Chem.** 278, 32037-32046, (2003)
- 4) Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., Hudspeth, A. J., Friedman, J. M., Heller, S. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. **Cell.** 103, 525-535, (2000)
- 5) Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G., Plant, T. D. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. **Nature Cell Biol.** 2, 695-702, (2000)
- 6) Liedtke, W., Friedman, J. M. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 100, 13698-13703, (2003)
- 7) Bossus, M., Charmantier G., Lorin-Nebel, C. Transient receptor potential vanilloid 4 in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*: A candidate protein for osmosensing. **Comp. Biochem. Physiol. A** 160, 43-51, (2011)
- 8) Watanabe, S., Seale A. P., Grau, E. G., Kaneko, T. Stretch-activated cation channel TRPV4 mediates hyposmotically induced prolactin release from prolactin cells of mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 302, R1004-1011, (2012)
- 9) Seale, A. P., Watanabe, S., Breves, J. P., Lerner, D. T., Kaneko, T., Grau, E. G. Differential regulation of TRPV4 mRNA levels by acclimation salinity and extracellular osmolality in euryhaline tilapia. **Gen. Comp. Endocrinol.** 178, 123-130, (2012)
- 10) Saito, S. and Shingai, R. Evolution of thermoTRP ion channel homologs in vertebrates. **Physiol. Genomics.** 27, 219-

230, (2006)

- 1 1) Inoue, K., Takei, Y. Diverse adaptability in *Oryzias* species to high environmental salinity. **Zool. Sci.** 19, 727-734, (2002)
- 1 2) Miyanishi, H., Inokuchi, M, Nobata, S., Kaneko, T. Past seawater experience enhances seawater adaptability in medaka, *Oryzias latipes*. **Zool. Lett.** 2, 12, (2016)
- 1 3) Hori, S., Sakamoto, N, Saitoh, O. Cloning and functional characterization of medaka TRPV4. **Comp. Biochem. Physiol. A** in press

## 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。