

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2016.3) 16:18-19.

平成25・26年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 7) TRPC
ノックアウトマウスを用いた瞳孔括約筋収縮機構の解明

金子 智之

7) TRPC ノックアウトマウスを用いた瞳孔括約筋収縮機構の解明

研究代表者 金子 智之

【目的】

眼内平滑筋の自律神経刺激に伴う収縮の持続相は、他の多くの平滑筋の場合と同様、細胞外からの Ca^{2+} 流入を必要とするが、その分子実体や作用機序に関してはいくつかの候補があるものの、詳細は分かっていない。これまでに本研究室では、ウシ毛様体筋（遠近調節のための眼内平滑筋）における実験により、持続相における Ca^{2+} 流入が単位コンダクタンスの異なる2種類の非選択性陽イオンチャネル (NSCC) を介することを示した。それらの分子候補としての TRPC1、TRPC3、TRPC4、TRPC6 や Orail などの発現もすでに確認しているが、ウシ材料では遺伝子ノックダウンなどの適用が困難で、また遺伝子改変動物の利用は事実上不可能あるため NSCC との関連についての検討は行き詰まっており、詳細はいまだ不明である。そこで、血管平滑筋において NSCC との関連が注目されている TRPC3 と TRPC6 に着目し、これらのノックアウトマウスを用いた実験系の構築を進めており、現在までに非侵襲的に実験可能な対光反射による瞳孔収縮径の解析手法を確立し測定を続けている。本研究ではマウスの瞳孔括約筋という微小な平滑筋の持続相に TRPC3 と TRPC6 の遺伝子欠損が与える影響を詳細に調べることでその分子実体を明らかにすることを最終目標として研究を遂行した。

【方法】

8 ~ 12 週齢の雄の TRPC3 および TRPC6 ノックア

ウトマウスの四肢を固定し、暗闇で 30 分暗順応させた後、LED の光刺激を用いて対光反射を誘発させ、記録は赤外線から可視光まで記録可能な CMOS カメラに顕微鏡用の対物レンズを直結したものをを用いて LED 照射前から記録し、その画像データから暗順応中の瞳孔径、縮瞳後の瞳孔径、収縮の時定数を求め、野生型と遺伝子改変マウスとで比較を行った。

ダブルノックアウトマウスの作製は 129Sv 系統の TRPC3 ノックアウトマウスと TRPC6 ノックアウトマウスを交配させることで行った。まず両者の交配によって TRPC3 および TRPC6 ともにヘテロの個体を得た。交配によって得られた仔マウスは耳片をサンプルとした genotyping を KAPA MG KIT (KAPA BIOSYSTEMS) を用いて行い、そこから得られた遺伝子型に応じて選別し、交配を繰り返し行うことで作製を進めた。

【結果と考察】

TRPC3 および TRPC6、さらに野生型を加えた3系統での比較において、収縮前後における瞳孔径、および収縮速度において、現在までに有意な差を確認することはできなかった。しかし眼内平滑筋を材料にはしていないものの、TRPC3 と TRPC6 はそれぞれ単独のノックアウトでは野生型と有意な差は見られないが、両方をノックアウトすることではじめて影響が出るという報告¹⁾もあることから、TRPC3 と TRPC6 は瞳孔括約筋においても相補的に働いている可能性が考えられ、このことを確かめるためにダブルノックアウトマウスを用いた検証が必須である。しかしながら、結果として TRPC3/6 ダブルノックアウトのマウスを得ることはできたものの、ヘテロマウスからのダブルノックアウトマウス産生は極めて効率が悪く、また設備の問題から繁殖が小規模にしか行えなかったために、ノックアウトマウスを得るまでに予想以上の時間を要した。加えて少数の得られたマウスはすべて繁殖のために維持せねばならなかったため、現在までに実験遂行に必要な個体数を確保することはできなかった。今回の研究期間内でダブルノックアウトマウスの測定結果を比較検討するには至らなかったが、今後も交配による繁殖を進め、このダブルノックアウトマウスと TRPC3 および TRPC6 それぞれのノックアウトマウス、および野生型マウスを比較することによって、瞳孔括約筋収縮の持続相における TRPC チャンネルの関与

が明らかになっていくと期待される。

【文 献】

- 1) Quick K, Zhao J, Eijkelkamp N, Linley JE, Rugiero F, Cox JJ, Raouf R, Gringhuis M, Sexton JE, Abramowitz J, et al (2012) TRPC3 and TRPC6 are essential for normal mechanotransduction in subsets of sensory neurons and cochlear hair cells. *Open Biology* 2 : 120068-120068