

# AMCoR

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

旭川医科大学研究フォーラム (2009.03) 9巻1号:49～50.

平成19年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト課題  
3) 視機能研究におけるモデル実験動物としての駆除指定動物アライグマ  
の利用

大日向 浩

### 3) 視機能研究におけるモデル実験動物としての駆除指定動物アライグマの利用

研究代表者 大日向 浩

#### [研究の背景と目的]

北米原産の食肉目アライグマは、夜行性動物に特徴的な桿細胞を主とする発達した網膜と霊長類以外で最も発達した遠近調節能をもつとされるが、視機能に関する学術的論文がわずか数報しかない。ヒトやサル eyeball の入手が困難な中、本種は平成16年制定の通称『外来生物法』により侵略的外来種として数多く捕獲駆除されているため、有望な実験材料となる可能性がある。本研究は、北海道で多数捕獲駆除される野生化アライグマの眼球を用い、視覚・遠近調節機能研究のための実験系を確立することを目的とする。

#### [研究方法]

アライグマの捕獲は、北海道大学地域システム科学講座アライグマ研究グループ代表の阿部豪博士に依頼した。個体を殺処分後、摘出した眼球から切り出した毛様体の凍結保存試料を用いて mRNA を抽出し、RT-PCR 法により、5' RACE- と 3' RACE-cDNA を作製した。両 cDNA を用い、TRPC 型陽イオンチャネルの mRNA の有無を PCR 法にて検討した。さらに、TRPC 蛋白質は mRNA 抽出後の破砕液を用い、Immunoblot 法にて調べた。

#### [研究成果]

当別町内のトラップで捕獲された成獣 (図 1: 雄、4.5kg) を殺処分後、眼球を摘出した (図 2)。夜間に十分な視覚を得る必要あるアライグマは夜行性動物に特徴的な広い瞳孔と大きなレンズを持っていた (図 2 & 3)。

この成獣の眼球のサイズは1.3cm前後 (図 2) であり、成人の1/2弱程であった。眼球を前後半分に切り開き、内側からレンズを外して毛様体組織 (図 4 の白



図 1 捕獲された成獣アライグマ 図 2 摘出した眼球

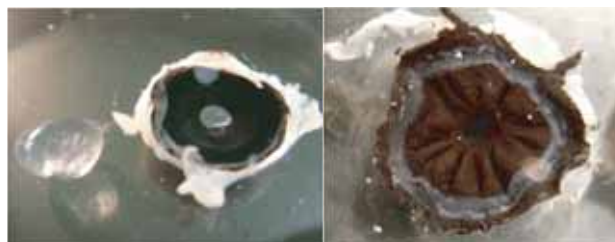


図 3 レンズを摘除した眼球 図 4 毛様体組織

く半透明で細長い環状部が毛様体) を注意深く取り出した。

毛様体平滑筋の筋束幅は細く (図 4)、摘出筋束を用いた筋収縮 (張力) 実験は当面困難であると判断した。そこでまず、毛様体組織 (平滑筋を主とし、色素細胞、線維芽細胞、血管、神経が分布する結合組織) で発現している収縮調節関連蛋白質の分子解析を行うため、組織を一度 -80℃ で凍結保存した後、片眼分の毛様体組織から mRNA を抽出し、5' RACE- と 3' RACE-cDNA を作製した。

当教室では、ウシ、ブタ、モルモットなどの毛様体筋を含む種々の平滑筋組織で TRP 型陽イオンチャネル (TRPC 亜型) のいくつかが発現していることを RT-PCR 法と免疫蛍光染色による組織学的方法により確認している。そこで、アライグマ毛様体における TRPC の各サブタイプの発現の有無や程度を調べた。

視機能関連分子の遺伝子解析の研究報告がまったく見られないアライグマでは、TRPC 遺伝子配列は報告されていない。そのため、他の動物種の TRPC 遺伝子配列データを比較して、塩基配列の保存性の高い領域をアライグマも共有する TRPC mRNA 配列と予想し、各 TRPC サブタイプの遺伝子検出・増幅に用いる PCR 用のプライマーペアを決定した。各 TRPC サブタイプペアを用いた PCR 産物の予想塩基サイズはそれぞれ、TRPC1 (369塩基対)、TRPC2 (206塩基対)、TRPC3 (525塩基対)、TRPC4 (304塩基対)、TRPC5 (275塩基対)、TRPC6 (290 & 835塩基対)、TRPC7 (1090塩基対) であった。

今回作製したアライグマ 5' RACE- と 3' RACE-cDNA を鋳型として、上記 TRPC プライマーペアを用いた PCR を行った (図 5、SYBR-Gold 蛍光染色後の階調反転像済み)。予想した PCR 断片のサイズ通りの PCR 産物は、5 種類の TRPC (TRPC1、3、4、5、6) で検出された (図 5、白線の黒塗り ▲)。一方、

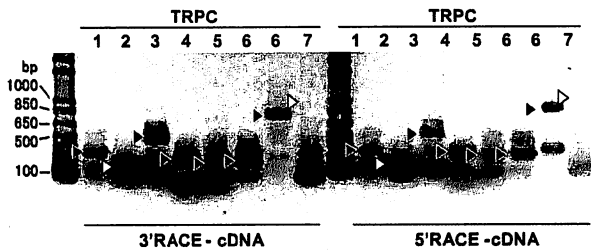


図5 PCR産物のアガロースゲル電気泳動像

TRPC2とTRPC7は今回のプライマーとPCR条件では増幅されなかった(図5、白抜き△)。

次に、今回 mRNA 抽出後の組織破砕液中の蛋白質を SDS ゲル電気泳動で分離後、抗 TRPC (抗 TRPC1、3、4、4/5、6N 末端、6C 末端、3/6/7) 抗体を用いた Immunoblot を行った。mRNA 抽出後の試料を用いたため各蛋白質は部分分解を受けているのか、予想分子量域にバンドは見られなかったが、抗 TRPC1、4/5、6N 末端抗体では分子量50Kd前後の部位に明瞭なバンドが検出された。

[考察]

日本には棲息していなかったアライグマは、人気アニメの影響で70年代からペットとして輸入後、遺棄や逃亡などにより野生化していった。幅広い環境への高い適応力と旺盛な繁殖力、さらには天敵が不在である日本では急速に数を増し、40を超える都道府県で棲息が確認されている。雑食性で食欲旺盛なため、農作物のみならず生態系に致命的な打撃を与える恐れがある他、狂犬病やエキノコックス症のなどを媒介することも懸念されている。2007年度の捕獲数は2306匹と年々急増(図6、北海道庁発表データより)し、農作物被害も農林水産省の2006年度調査では少なくとも16都道府県で計約1億6400万円に上り、北海道は兵庫県について被害額が多いと報告された。現在、道内の生態系からの排除を目指し、環境省や北海道、旭川市でも捕

獲が実施されるようになった。

アライグマの捕獲を依頼した阿部博士らのグループは、『アライグマが在来生態系に及ぼす影響評価と根絶の実現可能性の検討』を共通テーマに道内の若手研究者で構成され、2004年5月から毎年多くのアライグマを捕獲処分している。捕獲後は毛皮や食肉などの商業需要が見込めないため、同グループでも感染症等の検査用血清や食性調査用の消化管、年齢査定用の頭骨、繁殖状況推定用の子宮、DNA 用被毛・筋などを採取しているが、十分に検体を活用しきれない悩みを持つ。

このように、侵略的外来種である野生化アライグマは少なくとも今後何年かにわたって実験動物として無償かつ豊富な個体数での提供を受けることが可能であり、TRPCを始めとした網膜、眼内筋における視覚・遠近調節に重要な各種蛋白の遺伝子解析が可能であること、さらには毛様体筋の単離細胞における収縮調節に関与する受容体作動性陽イオンチャネルと信号伝達機構の電気生理学的検討に有用な実験系となりうることが明らかとなった。

[まとめ]

視機能研究のモデル実験動物として、野生化アライグマの利用の可否を検討した。眼球から毛様体組織の摘出が比較的容易なこと、本組織の mRNA 抽出や cDNA 作製が容易に行えることが確かめられ、実際に本組織において mRNA レベルで少なくとも5種類 (TRPC1、3、4、5、6) の TRPC が発現していることを明らかにできた。本種の視機能研究への利用は駆除後の有効利用のみならず、視機能研究の有用な実験系として期待できる。

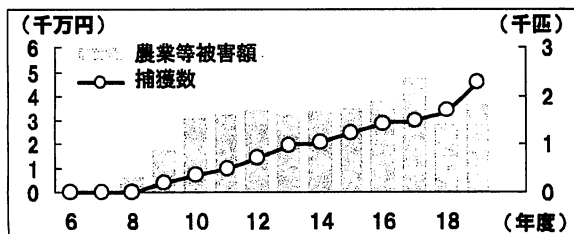


図6 道内でのアライグマの捕獲数と農業被害額