材料と方法

材料一覧

**ゼブラフィッシュの飼育**

すべてのゼブラフィッシュは明期14時間/暗期10時間のサイクル、塩濃度0.03%、水温28.5 ℃の条件で飼育した。性成熟後の雄雌は別の水槽に分けて飼育し、これらの個体を交配することで次世代を得た。交配を行う際、受精卵を得たい日の前日夕方に小型水槽と、底面が網状の水槽を重ね、そこに雌を入れ、さらにその上に網底水槽を重ねた上で雄を入れた。この状態で一晩飼育した後、翌朝に網底水槽を1段取り除き、雄雌を混合して産卵させ、水槽の底面に落ちてきた受精卵を回収した。受精卵は10 cmディッシュに回収し、28.5 ℃のインキュベーターで発生させた。稚魚の飼育水は成体の飼育に用いている水に終濃度3×10-5 %となるようにメチレンブルーを加えたものを用いた。必要に応じて、静菌のためにアンピシリンを終濃度0.5 mg/ml、稚魚への色素沈着を抑えるために1-phenyl 2-thiourea (PTU)を終濃度0.003%となるように加えた。

Tg, KOの樹立

-プラスミドコンストラクション

　Gibson Assemblyシステムを用いて、プロモーター領域をベクターにアセンブルさせた。Tol2システムを用いて、L200とR150の間にある配列をゼブラフィッシュゲノム中に挿入するためのプラスミドであるpT2AL200R150Gを基に、このプラスミドに含まれているGFPをコードする領域をlifeactRFP (lifeactはF-actin結合モチーフ)に置き換えたプラスミドpT2A-ef1α: lifeactRFPを用いた。

-プラスミドインジェクション

-gRNA Cas9インジェクション

-ジェノタイピング

**ツボクラリン処理**

　METチャネルの阻害剤として、Curare (D-tubocurarine, Nacalai 35637-84)を用いた。Curareは 7.7 mgを1 mlのH2Oに溶解させ10 mM stockとし、40 μlずつ分注して-30 ℃で保管した。working solutionはstockを飼育水でx100希釈し、100 μM curareとして用いた。阻害剤処理は24 well plateを用いて行い、1 wellに5 larvae, 1 mlの飼育水または100 μM curareを入れて遮光し、28.5 ℃で目的の時間まで処理した。24時間を超える処理実験では24時間ごとに新しい液に交換した。

　ライブイメージングでは、低融点アガロースゲルで保定したゼブラフィッシュに対し、観察対象としたL3感丘付近のゲルをピンセットで取り除き、他の撮影条件を整えた後に、スポイトで飼育水を可能な限り除去し、100 μM Curareでガラスボトムディッシュを満たした状態で撮影を行った。

**免疫染色**

　免疫染色に用いるサンプルは4% PFA/ PBSで4℃, O/Nで固定した。PBSで10分間, 2回の洗浄を行ったあと、1% Triton-X/ PBSを加えて20分間室温で静置し、その後MABDTで5分間, 3回の洗浄を行った。引き続いて2% FBS/ MABDT (以下blocking solution)で1時間ブロッキングし、一次抗体をblocking solutionで希釈して4℃, O/Nで反応させた。翌日、一次抗体を回収してMABDTで15分, 6回の洗浄を行った後、二次抗体をblocking solutionで希釈して4℃, O/Nで反応させた。さらに翌日に二次抗体を回収してMABDTで15分, 6回の洗浄を行い、その後必要に応じてHoechst33258/ PBS 1:1000で核染色して共焦点レーザー顕微鏡による撮影を行った。

**4-Di-2-Asp染色**

　3.94 mgの4-Di-2-Aspを10 mlのDMSOに溶かし、1 mM stockとし、遮光して常温保存した。METチャネルの機能を評価するために、6 dpfのlarvaeを24 well plateに5 larvae/ wellで入れ、1 mlの飼育水またはcurareで処理した。1時間28.5℃でインキュベートした後に、4-Di-2-Asp stockを 20 μl添加し、手で30秒間上下左右に振った。その後10 cm dishに稚魚を移し、3回wash out した。引き続いてTricaine処理を行い、1% low melting agaroseにマウントしてconforcal microscopeでhair cell の撮影を行った。撮影は561 nm laser を2%の強度で照射し、野生型の感丘において有毛細胞の蛍光強度がサチュレートしないようにGainを調節してから、撮影条件を変えずにMETチャネルの機能阻害条件(curare処理、または*tmc2a tmc2b* DKO)の個体を撮影した。

**マウント**

　画像取得を行う際は、1.2 %低融点アガロースゲルを用いて稚魚をガラスボトムディッシュ底面に包埋した。ライブイメージングでは稚魚が動いてしまい、画像が乱れることを防ぐためにTricaineを用いて麻酔処理を行った。

　TricaineはOO mM stockを-30℃で保存した。3.5 cmディッシュに処理する稚魚を入れ、稚魚と共に持ち込んだ飼育水をスポイトで可能な限り除去した後、新たに飼育水を4 ml入れた。ここにTricaineを37.5 μl 加え、10分インキュベートし、先を丸めたガラスニードルでつついて麻酔の作用を確認した。稚魚が反応する場合、麻酔の作用が確認できるまで同じ過程を繰り返した。インキュベートしている間に、1.2%低融点アガロースを42 ℃のヒートブロックで溶かしておき、麻酔の作用を確認できた濃度と等濃度になるようにTricaineを加えた。

　42 ℃で溶かした1.2 %低融点アガロースゲルを250 μlガラスボトムディッシュの中央に入れ、そこに可能な限り麻酔液を持ち込まないようにスポイトで稚魚を移し、素早く先を丸めたガラスニードルで稚魚をガラスボトムディッシュ底面に寝かせるように保定した。この状態でアガロースゲルが固まるまで室温で静置した。アガロースゲルが固まったことを確認した後、乾燥を防ぐために麻酔液をアガロースゲルの上から加えた。

**共焦点レーザー顕微鏡**

　上記の通りに準備したサンプルのpLL L3感丘をLSM710またはLSM980 (Zeiss)で撮影した。解析に用いた画像は全てx40水浸レンズを用いて、x3.5のデジタルズームをかけた状態でstereociliaの先端から感丘の底面が映りきる範囲を撮影した。ライブイメージングは5分間隔でOO回撮影した。young hair cellとmature hair cellの区別にはlambda scanning modeを用い、liner unmixing modeでdTomatoとlifeactRFPのシグナルを分離した。

**画像処理**

　取得した画像はZen black, Fiji (ImageJ)で解析した。有毛細胞数、支持細胞数はz軸を動かしながら数え漏れのないようにZen blackのgraphicツールで印をつけながら定量した。

4-Di-2-Asp uptake assayは最も多くの有毛細胞が見える1枚のスライスの明視野画像と蛍光画像をTiffファイルで出力し、Fijiの範囲選択ツールで明視野画像から有毛細胞と思われる細胞の周囲を選択しROIとして選択したあと、蛍光画像で同じ範囲のROIを表示してMean intensityを計測した。

**統計解析**

　統計解析はp< 0.05とし、Python3.7.12を用いて行った。ライブラリとして、Pandas, scipy, NumPyを用いた。4-Di-2-Asp uptake assay, 感丘の大きさ、有毛細胞数の定量、支持細胞数の定量、pH3陽性細胞数の定量データのcurare処理個体とcontrol個体の比較はWelchのt検定を行った。また、cleaved Caspase3染色の結果はFisher’s exact testを行った。tmc2a tmc2b DKO個体の検定にはANOVAを用いた。また、Matplotlib, Seabornライブラリを用いて定量データからバイオリンプロットを作成した。