

審査の結果の要旨

氏名 柳 靖雄

本研究では網膜視細胞特異的因子の発現制御を解明する目的で、脊椎動物の視細胞および発生学的に視細胞と近縁関係にある松果体に特異的に発現が見られ、視細胞の最終分化および機能維持に重要な役割を担っているペアードクラスのホメオボックス型転写因子 CRX (cone-rod homeobox) の転写活性化機構の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. GAL4 融合 CRX 蛋白質と GAL4 ルシフェラーゼレポーターを用いたルシフェラーゼアッセイを行い CRX の活性が視細胞においてのみ観察されるのか、他の細胞においても同様に観察されるのかを様々な培養細胞で検討した。その結果、ヒト腎臓由来 293T 細胞、サル腎臓由来の COS-1 細胞、ヒト子宮癌由来の HeLa 細胞、網膜芽細胞種由来の Y79 細胞の、いずれの細胞を用いても、同程度の CRX の転写活性が観察された。
2. CRX の様々な欠失変異体を用いてルシフェラーゼアッセイを行い転写活性化領域を同定した結果、293T 細胞、COS-1 細胞、HeLa 細胞いずれを用いても CRX の転写活性化領域は、219 から 267 アミノ酸を含む領域に存在する事が分かった。これらの結果から、使用する細胞種に関係なく CRX のカルボキシ末端の 219 から 267 アミノ酸を含む領域に転写活性化領域が存在することが示された。また、細胞種特異的転写共役因子が存在するのではなく、これらの細胞に共通に発現する転写共役因子が CRX の転写活性化に関わっている事が示唆された。
3. CRX が、酵母内においても転写活性化能を持つか、持つならば、その転写活性化領域がどこであるかを検討した。その結果、酵母内でも 156-300 アミノ酸残基を含む領域に転写活性が認められることが示された。この領域は培養細胞内で転写活性を認めた 219-269 アミノ酸を含む領域であった。これらの結果から、CRX の転写活性に必要な転写共役因子の機能を代替する因子が酵母内でも存在する可能性が示唆された。
4. 次に、これまでの研究から多数の転写因子の転写共役因子として働くと分かっている p300/CBP や p160 family 蛋白質が CRX の転写活性に影響を及ぼすか否かを検討した。全長の CRX の転写活性化能を測定するネイティブなエンハンサー配列としてのヒト blue cone pigment 遺伝子の転写制御領域を用いたルシフェラーゼアッセイ、および、GAL4 融合 CRX 蛋白質と GAL4 ルシフェラーゼレポーターを用いたルシフェラーゼアッセイの結果、p300, CBP の存在下でのみ CRX の転写活性化能の増強が見られた。

5. 次に p300/CBP による CRX の転写活性化能増強作用が、p300/CBP が CRX に直接相互作用する事によって発揮されるのか、それとも別の因子を介した間接的な作用によるのかを明らかにするため、*in vitro* の pull down assay にて両者の直接の相互作用の検出を試みた。その結果、CRX は *in vitro* で直接 p300/CBP に結合することが明らかとなった。
6. 更に、CRX と p300/CBP の相互作用が *in vivo* においても観察されるか否かを確認し、その相互作用に必要な p300/CBP および CRX の領域を決定するために p300/CBP および CRX の様々な欠失変異体を用いて mammalian two-hybrid assay を行った。その結果、全長の CRX は、p300 とはカルボキシ末端の 1600 から 2414 アミノ酸を含む領域と、CBP とはカルボキシ末端の Q-rich domain を含む領域に強く結合することがわかった。また、CRX の p300 との相互作用に必要な領域を同様に mammalian two-hybrid assay で決定した結果、CRX は転写活性化領域を含む 219 から 267 アミノ酸を含む領域で p300 と結合することが明らかとなった。これらの結果から、p300/CBP が CRX の転写共役因子として働くと考えられた。

以上、本論文はこれまで未知であった CRX の転写活性化領域を明らかにし、さらに、その転写共役因子を介した転写活性化機構を明らかにした。本研究ではこれまで未知であった視細胞発育分化における転写因子活性化機構解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。