

## 論文内容の要旨

### Pineal Photoreceptor Cell-Specific Gene Expression in the Zebrafish (ゼブラフィッシュにおける松果体特異的な遺伝子発現の分子メカニズム)

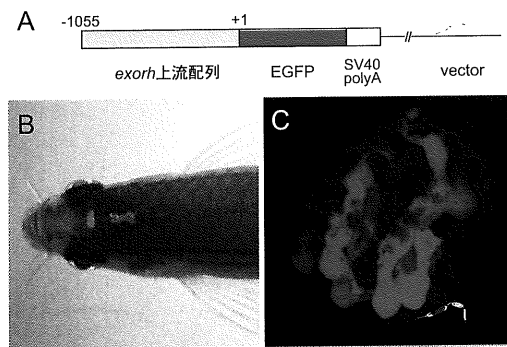
真野 弘明

松果体の光受容細胞は、外節構造を持った細胞形態やオプシンをはじめとする一群の発現遺伝子など、多くの点において網膜視細胞と類似性を示す。一方で、松果体と網膜の生理機能は大きく異なっており、前者は概日リズム形成と内分泌、後者は視覚機能において主要な役割を果たす。松果体と網膜の類似性や、それぞれの特異性を規定する分子メカニズムの解明は、“いかにして脳の特定の領域・細胞がアイデンティティーを確立するのか”という脳神経科学の重要課題につながるとともに、両組織の進化的な関係を推測する上で非常に興味深い。最近になって、網膜視細胞と松果体細胞の双方において機能する転写因子として Crx (cone-rod homeobox) が同定された。Crx は、光受容細胞に特異的な多数の遺伝子の活性化を担っており、両細胞の類似性の形成に大きく寄与するものと考えられる。これに対し、網膜または松果体それぞれに特異的な遺伝子発現の制御機構についてはほとんど明らかになっていない。特に、松果体の生理機能および遺伝子発現の分子メカニズムに関する知見は乏しく、両組織を比較解析する上でのボトルネックとなっている。

私は、遺伝学的モデル生物のゼブラフィッシュを用いて、松果体特異的な機能発現の分子メカニズムに迫ろうと考えた。硬骨魚類の松果体の光受容分子は未知であったため、まずゼブラフィッシュ松果体に存在する光受容蛋白質の検索を行った。その結果、ゼブラフィッシュ松果体には、ロドプシンと類似の新規オプシンが発現していることを見出した。私はこのオプシンを、眼球外

(extra-ocular)に発現するロドプシンという意味でエクソロドプシン(exo-rhodopsin; *exorh*)と命名した。分子系統学的解析から、*exorh* 遺伝子は、硬骨魚類の進化初期にロドプシン遺伝子が重複して生じたと推測された。この考えは、種々の脊椎動物ゲノムを用いたサザンブロットと、他の硬骨魚から *exorh* 相同遺伝子を単離することによって裏付けられた。

*exorh* 遺伝子とロドプシン(*rh*)遺伝子は、分子進化的に非常に近縁でありながら、松果体と網膜にそれぞれ特異的に発現している。このため、*exorh* 遺伝子の転写調節領域は、松果体特異的な遺伝子発現メカニズムの解析に適しているのみならず、進化的な観点から *rh* 遺伝子の網膜特異的な発現機構と比較解析を行える点において優れたモデルとなる。そこで私は、*exorh* 遺伝子のプロモーター領域を単離し、ゼブラフィッシュのトランスジェニック技術を利用した機能解析を試みた。まず、ゼブラフィッシュのゲノムDNAから、*exorh* 遺伝子上流配列 1055-bp をクローニングした。単離した上流配列が組織特異的なプロモーターとして機能することを確かめるために、下流にレポーター遺伝子 EGFP を連結した発現ベクターを構築し、これを用いて独立多数のトランスジェニック系統を樹立した。蛍光顕微鏡下においてトランスジェニック個体を観察した結果、いずれの系統においても松果体特異的な EGFP 発現を確認することができた(図 1)。



【図1】 *exorh* 上流配列による松果体特異的なEGFPの発現誘導

- (A)レポーターコンストラクトの模式図
- (B)トランスジェニック個体(成魚)
- (C)トランスジェニック個体(稚魚)の松果体拡大像。光受容細胞に特有の外節様構造が確認できる。

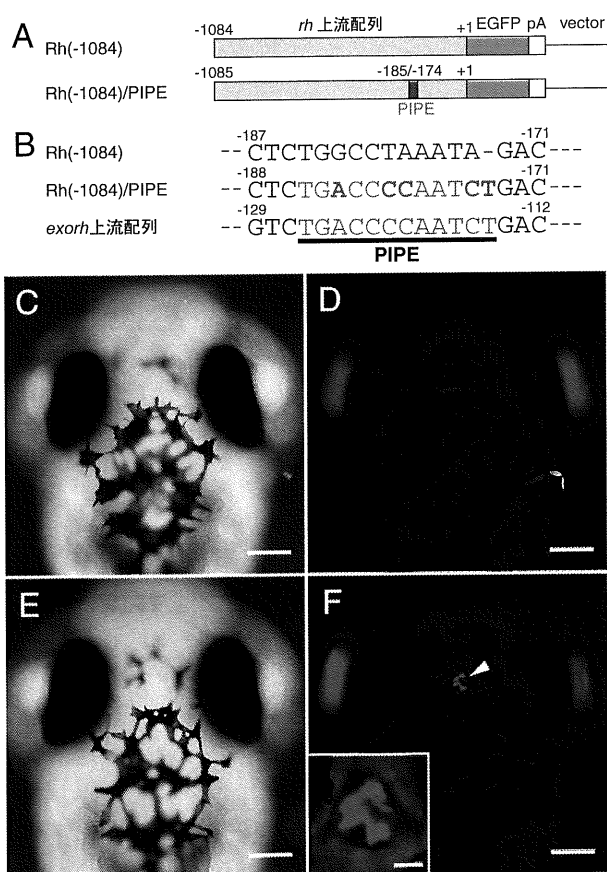
次に、松果体特異的な発現に必要なプロモーター領域を絞り込むために、*exorh* 遺伝子上流配列を段階的に欠失させたコンストラクトを作製し、上記と同様の解析を行った。その結果、翻訳開始点から上流側 147-bp の領域のみで松果体特異的な遺伝子発現を誘導できることが明らかになった。この 147-bp の領域内には、3箇所の Crx/Otx 結合配列が存在していたが、*rh* 遺伝子上流配列内で高い保存性を示す Nrl 結合配列(NRE)は見出せなかった。先行研究により、網膜の *rh* 遺伝子は Crx と Nrl により協調的に転写活性化を受けることが示されている。この知見をもとに類推すると、松果体においては Crx と(機能的には Nrl に対応する)未知の転写活性化因子の組み合わせによって、組織特異的な遺伝子発現が誘導されると考えられる。私は、この仮説を検証するために、*exorh* 遺伝子プロモーターのより詳細な解析を試みた。まず、*exorh* 上流配列 147-bp の内、TATA ボックスより上流の 88-bp の領域に、それぞれ 11-bp の欠失を持つ8種類のコンストラクトを作製した。これらをゼブラフィッシュ胚に遺伝子導入し、一過的な EGFP 発現を解析した結果、上述の3箇所の Crx/Otx 結合配列に加えて、既知の配列を含まない 22-bp の領域の欠失によっても松果体で

の発現が消失することを見出した。そこで次に、この 22-bp の領域内の塩基対を 3-4 塩基ずつ体系的に置換した7種類のコンストラクトを作製し、上記と同様の解析を行った。その結果、松果体における遺伝子発現に必要な領域を 12-bp まで絞り込むことができた。私は、この 12-bp の新規配列を PIPE (pineal expression promoting element) と命名した。

これら一連の解析結果は、PIPE が松果体特異的な遺伝子発現を担っている可能性を示唆する。一方で、PIPE を介した転写活性化は組織特異的なものではなく、単に遺伝子発現の強度を上昇させている可能性も考えられる。これらの可能性を検証するために、網膜特異的な遺伝子発現を誘導する *rh* 遺伝子プロモーターに PIPE を導入する実験を行った。具体的には、*rh* 遺伝子プロモーター内に存在する PIPE と同一性を示す領域に対して 4 塩基の変異と 1 塩基の挿入を行うことにより、外来性の PIPE を持つ発現ベクターを構築した (図 2A, B)。これを用いてトランスジェニック個体を作製した結果、網膜に加えて松果体においても EGFP 発現が観察され、他の組織においては EGFP の発現誘導は認められなかった (図 2F)。この結果は、PIPE が松果体特異的な活性を持つシスエレメントであることを強く支持する。さらに、

*rh* 遺伝子プロモーターの 5' 側に PIPE を付加したコンストラクトを用いても、同様に松果体における EGFP 発現が確認され、上述した松果体における発現誘導が *rh* プロモーター配列の変化によるものではないと結論できた。以上の結果から、松果体の光受容細胞に特異的な遺伝子発現においては、PIPE と *Crx/Otx* 結合配列の組み合わせが中心的な役割を果たしていると考えられた (図 3)。

脳神経系の研究において、特定の神経細胞の純粋な集団を単離することができれば、さまざまな分子生物学的アプローチが可能になる。私は、上記の研究において作製したトランスジェニック個



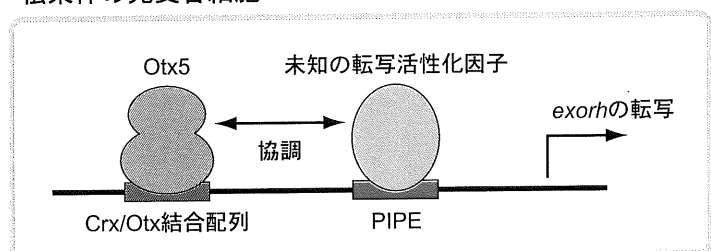
【図2】 PIPEによる松果体特異的な発現誘導

*rh* プロモーターに変異を導入し、異所的な PIPE を作り出した (A, B)。 *rh* プロモーターは本来、網膜桿体に特異的な発現を誘導するが (D)、 PIPE を導入したコンストラクトは本来の発現部位に加え、松果体においても EGFP の発現を誘導した (F)。

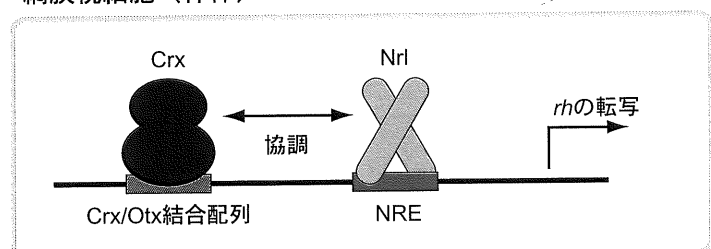
体では、松果体の光受容細胞あるいは網膜桿体が特異的にEGFPでラベルされている点に着目し、蛍光セルソーターを利用してこれらの細胞を分取する実験系の確立を試みた。その結果、松果体細胞および網膜桿体それぞれについて、非常に高純度の細胞集団を単離することに成功した。このようにして分取した松果体細胞および網膜桿体からRNAを調製し、Ordered Differential Display法を用いて両者の遺伝子発現プロファイルを比較した。総数7,073本の増幅バンドのうち、263本が松果体細胞に、294本が網膜桿体にそれぞれ特異的もしくは非常に強く発現している遺伝子の増幅バンドとして検出された。これらのうち、松果体の光受容細胞に選択的に発現している遺伝子断片の塩基配列を決定し、ESTおよびゲノムデータベースの検索を行った結果、73個の遺伝子に関して既知遺伝子との相同性が確認された。光情報伝達に関連する遺伝子として、*exorh* 遺伝子に加えて、松果体細胞に選択的に発現する2種類のリカバリン遺伝子を同定した。また、cGMPホスホジエステラーゼおよびcGMP感受性チャネルのそれぞれに関して、(網膜)錐体型のサブユニット遺伝子が松果体細胞に発現していることを見出した。この結果は、松果体の各々の光受容細胞内には桿体型(*exorh*)と錐体型の遺伝子産物が共存しており、それらが松果体独自の光情報伝達経路を形成している可能性を示唆する。光情報伝達系の因子以外にも、メラトニン生合成系酵素やイオンチャネル、トランスポーターなど、さまざまな機能的カテゴリーに属する遺伝子が松果体に選択的に発現していることを明らかにした。これらの遺伝子のさらなる解析は、松果体と網膜の機能的差異を生み出すメカニズムの解明につながると考えられる。また、同定した遺伝子群の周辺ゲノム配列を詳細に解析することによって、松果体における遺伝子発現に関するシスエレメントに関してより多くの情報が得られると期待される。

松果体特異的な遺伝子発現を担うシスエレメント、および松果体特異的な生理機能を形成する候補遺伝子群を同定した本研究の一連の成果は、松果体の分子生理学的研究に遺伝子レベルでの基盤を提供するとともに、光受容器官の多様性形成メカニズムの解明に向けて重要な知見を与えるものである。

松果体の光受容細胞



網膜視細胞（桿体）



【図3】松果体と網膜の光受容細胞における遺伝子発現のモデル