

論文審査の結果の要旨

氏名 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。論文提出者は、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へのアプローチを試みた。

硬骨魚類の松果体の光受容分子は未知であったため、論文提出者は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。論文提出者は、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 (*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、他の硬骨魚からの *exorh* 相同遺伝子の単離により裏付けられた。

次に、論文提出者は *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認するために、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の観察を行い、いずれの系統においても松果体特異的な EGFP 発現が誘導されていることを確認した。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 の領域のみでも松果体特異的な遺伝子発現を誘導できることを明らかにした。論文提出者は *exorh* 遺伝子プロモーターの詳細な欠失・変異実験を行い、既知の配列を含まない 12-bp の領域が松果体における遺伝子発現に必要であることを見出した。論文提出者は、この 12-bp の新規配列を PIPE (*pineal expression promoting element*) と命名した。さらに、PIPE に松果体特

異的な遺伝子発現を誘導する能力があることを確認するために、網膜特異的に発現を誘導する *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 と相同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、人工的な PIPE を持つ発現ベクターを構築した。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でも EGFP 発現が観察されたが、他の組織においては EGFP の発現誘導は認められなかった。この結果は、PIPE が松果体特異的な活性を持った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、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証明できた。以上の結果から、論文提出者は PIPE が松果体特異的な遺伝子発現を担うシスエレメントであると結論付けた。

論文提出者はさらに、これら EGFP トランスジェニック個体から、蛍光セルソーターを用いて松果体の光受容細胞および網膜桿体視細胞を極めて高純度に分取する実験系を確立した。分取した細胞の遺伝子発現プロファイルをディファレンシャルディスプレイ法を用いて比較した結果、松果体細胞に選択的に発現する遺伝子を多数同定することに成功した。

松果体特異的な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に寄与する候補遺伝子群を同定した本論文の成果は、光受容器官の多様性形成メカニズムの全容解明に向けて重要な基盤を提供すると考えられる。

なお、本論文は浅岡洋一・小島大輔・深田吉孝との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。