

## 論文内容の要旨

### Molecular Mechanism of Pineal-specific Gene Expression in the Zebrafish

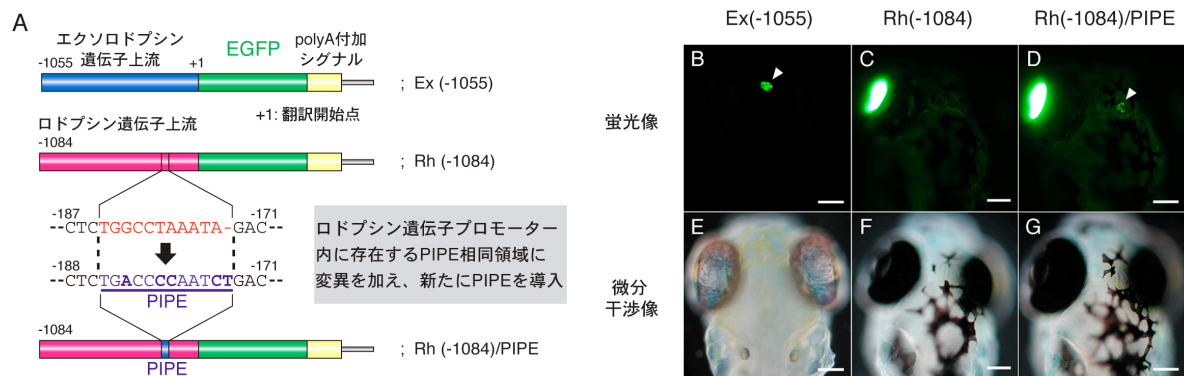
(ゼブラフィッシュ松果体の光受容細胞に特異的な遺伝子発現機構)

浅岡 洋一

松果体と網膜は共に間脳由来の光受容組織であり、両者の光受容細胞の間には、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、多くの類似点が認められる。にもかかわらず、松果体と網膜の生理機能は大きく異なり、前者は概日リズムの形成と内分泌機能に特化し、後者は主として視覚機能を司る。こうした「似て非なる」松果体と網膜の比較を通して両者それぞれに特異的な遺伝子発現機構を理解することは、脳組織の多様な機能分化の仕組みに迫る上で極めて重要であるとともに、両光受容組織の進化的な関係を推測する上で非常に興味深い。近年、光受容細胞に特異的な Crx (Cone rod homeobox) や、神経網膜に特異的な Nrl (Neural retina leucine-zipper) など数々の転写因子が同定され、網膜における遺伝子発現機構の解析は急速に進みつつある [Furukawa *et al.* (1997) *Cell*, **91**, 531; Swaroop *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 266]。その一方で、松果体の遺伝子発現メカニズムに関する知見は非常に乏しく、これまで「松果体と網膜の対比」という視点から両組織の遺伝子の転写調節機構を捉えることは困難であった。当研究室では1999年に、ゼブラフィッシュの松果体オプシンであるエクソロドプシン (*exorh*) を同定した [Mano *et al.* (1999) *Mol. Brain Res.*, **73**, 110]。 *exorh* 遺伝子とロドプシン (*rh*) 遺伝子は、分子系統学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、*rh* 遺伝子の網膜特異的な発現機構との比較解析が行える点において格好の研究対象と考えられた。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か否かを確認するため、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 [図 1A、Ex(-1055)]、これを用いて独立の複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 1B、矢頭)。



【図1】 *exorh* 遺伝子の *in vivo* プロモーター解析

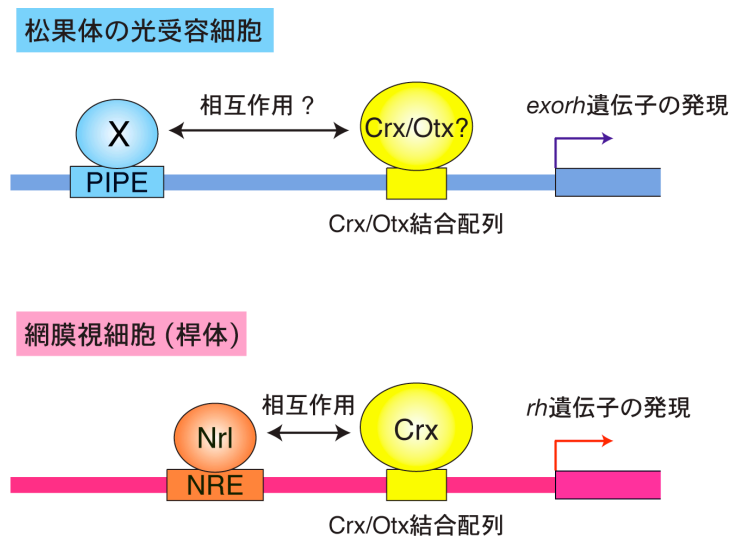
パネルA: 作製した各コンストラクトの模式図。パネルB: *exorh* 遺伝子上流1055-bpによる松果体特異的なGFPの発現誘導。蛍光顕微鏡を用いて受精7日後のトランスジェニック個体を背側から観察した。松果体(矢頭)においてGFPの発現が認められる。パネルC: *rh* 遺伝子上流1084-bpによる網膜特異的なGFPの発現誘導。蛍光顕微鏡で受精7日後のトランスジェニック個体を背側やや左側から観察した。眼球のレンズを通して、網膜におけるGFPの発現が認められる(左目)。松果体においてはGFPの発現は全く認められない。パネルD: PIPEを導入した*rh* 遺伝子(変異導入)プロモーターによる異所的なGFPの発現誘導。蛍光顕微鏡で受精7日後のトランスジェニック個体を背側やや左側から観察した。網膜でのGFP発現に加え、松果体(矢頭)においてGFPの発現が観察される。パネルE-G: それぞれパネルB-Dの微分干渉像。スケールバーは100 μm。

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、上記と同様にして多くのトランスジェニック個体の解析を行った。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を見出した。この 147-bp の領域内には *rh* 遺伝子上流にも存在する Crx/Otx 結合配列が 3 つ見出された。このことは、Crx (もしくは Crx と同じファミリーに属する Otx) が網膜と松果体に共通の遺伝子発現に必須な転写因子であることと良く符合する。一方、多くの動物種の *rh* 遺伝子上流においては Nrl 結合配列 (NRE) が保存されているが、*exorh* 遺伝子上流には 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 によって協

調的に転写活性化を受けることが示されている [Chen *et al.* (1997) *Neuron*, **19**, 1017] (図2)。この知見をもとに類推すると、松果体においては Crx/Otx に加えて (機能的に Nrl に対応するような) 未知の転写活性化因子が存在し、Crx/Otx との組み合わせによって松果体特異的な遺伝子発現が誘導されるのではないかと考えられた。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 のうち、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、ふ化後の個体の一過的な 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、既知の配列を含まない 22-bp の領域の欠失によって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 の領域内を 3-4 塩基ずつ網羅的に置換した 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、最終的に、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う可能性を示唆する。しかし一方で、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という可能性も否定できない。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 相同領域に対して 4 塩基の変異と 1 塩基の挿入を施して人工的に PIPE 配列を導入し、これを EGFP 遺伝子に連結した [図 1A、Rh(-1084)/PIPE]。この発現ベクターを用いてトランスジェニック個体を作製した結果、本来、*rh* 遺伝子が発現しない松果体において、異所的な



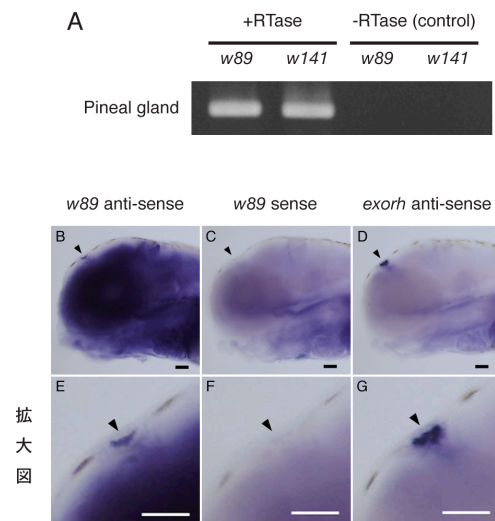
【図2】 松果体および網膜に特異的な遺伝子発現のモデル  
網膜の遺伝子発現には、光受容細胞に特異的な転写因子Crxと神経網膜に特異的な転写因子Nrlが関与する。CrxとNrlは直接的に結合し、*rh*遺伝子の転写を協調的に活性化する。この知見をもとに類推すると、松果体の光受容細胞では Crx (もしくはOtx)とPIPE結合因子 (図中のX) が協調的に働いて、松果体特異的な遺伝子発現が誘導されるのではないかと考えられる。

EGFP 発現が観察された (図 1D、矢頭は松果体を示す。図 1C と比較)。この結果は、PIPE が松果体特異的な遺伝子発現を導く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た場合にも、上記と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ことを示した。以上の結果から、私は 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した。

松果体の組織特異性を生み出す分子機構のさらなる理解には、PIPE に対して特異的に結合する転写因子の同定が不可欠である。そこで、酵母のワンハイブリッド解析系を用い、ゼブラフィッシュ cDNA ライブラリーから PIPE

結合因子を探索した結果、再現性のある陽性シグナルを示す 2 つのクローン (以下、クローン名 *w89* および *w141* として記述) を得ることができた。両クローンのコード領域全長の塩基配列を決定したところ、*w89* と *w141* がコードするタンパク質のアミノ酸配列は核内レセプターファミリーに属する Rev-erb と Ror に、それぞれ最も高い一致度を示した。RT-PCR 法 (図 3A) および *in situ* hybridization 法 (図 3B-G) により *w89* と *w141* の mRNA 発現パターンを解析した結果、両遺伝子は共に松果体において発現していることが確認された。

本研究では、進化的関連の深い松果体と網膜の光受容細胞の対比を通じ、松果体特異的な遺伝子発現を生み出すシスエレメント PIPE の同定に成功した。さらに、PIPE に結合し松果体特異性を規定すると考えられる候補因子の同定に至った。本研究の成果は、脊椎動物の光受容器官・組織の多様性を生み出す機構に迫る上で、重要な知見をもたらすものと考えられる。



【図3】 *w89*および*w141*のmRNA発現パターン  
 パネルA: RT-PCR解析。パネルB-G: *in situ* hybridization法による*w89*の発現解析。受精6日後のゼブラフィッシュ胚に対し、*w89* anti-sense鎖プローブ (B, E)、*w89* sense鎖プローブ (C, F)、または*exorh* anti-sense鎖プローブ (D, G) を用いた。パネルB-Dは、胚の頭部を左側面から観察したもの。松果体を含む脳神経部位において*w89*の発現が認められた。矢頭は松果体の位置を示す。パネルE-Gは、それぞれパネルB-Dの松果体を含む領域を拡大したもの。スケールバーは50  $\mu$ m。