

論文審査の結果の要旨

氏名 浅岡 洋一

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り、前者は概日リズムの形成や内分泌機能に特化し、後者は主として視覚機能を司る。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、“いかにして脳の多種多様な神経細胞の運命が決定づけられるか”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。こうした問題へのアプローチとして、両組織における遺伝子の発現調節機構を比較解析することは極めて有効である。近年、網膜での遺伝子発現の解析は急速な進展をみせている一方、松果体の遺伝子発現に関する知見は非常に乏しく、両組織の比較解析を行う上での大きな障壁となっている。そこで論文提出者は、ゼブラフィッシュにおいて松果体特異的な発現を示すエクソロドプシン (*exorh*) 遺伝子に着目し、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プロモーター解析を試みた。

まず、論文提出者は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。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。この 147-bp のプロモーター領域に対し網羅的な欠失・変異実験を行った結果、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なことを見出した。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、本来、*rh* 遺伝子が発現しない松果体において、異所的な EGFP 発現が観察された。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、同様に松果体における EGFP 発現を確認し、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証明した。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。

松果体特異的な遺伝子発現機構の理解をさらに深めるため、論文提出者は PIPE に対して特異的に結合する転写因子の単離を試みた。ゼブラフィッシュの cDNA から発現ライブラリーを構築し、PIPE 配列を bait とした酵母のワンハイブリッド法によって PIPE 結合因子のスクリーニングを行った結果、再現性のある陽性シグナルを示す 2 つのクローン (w89 および w141) を得ることに成功した。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 法および in situ hybridization 法により 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。

松果体特異的な発現を担うシスエレメント PIPE、および 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を同定した本論文の成果は、光受容組織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、本論文は真野弘明・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。