

所 属 (主指導教官)	分子発生生物学講座 (安田國雄教授)		
氏 名	小林未明	提 出	平成11年 1月 7日
題 目	網膜で発現するレセプター型転写因子サブファミリーの 同定と機能解析		
要旨	<p>抗夜盲症因子として同定されたビタミンAは、生体内で酸化されてレチナール、レチノイン酸 (RA) を生じる。レチナールは光受容体の構成成分としてシグナル伝達に参与している。一方RAは細胞核内の受容体タンパク質に結合して遺伝子の転写調節を行うシグナル伝達分子として作用する。個体発生において過剰のレチノイン酸 (RA) が網膜に奇形を誘導したり、レチノイン酸レセプター(RAR/RXR) 遺伝子を欠失したマウスで眼の形成が不全となるなど、ビタミンAとその代謝物(レチノイドと総称される)は眼の器官形成とその機能維持に重要な働きを担っている。その機構を理解するためには、1) レチノイドの代謝、2) レセプターの発現制御、3) RAによる転写調節、等の観点にたった研究が必要である。</p> <p>本研究は、眼の器官形成、機能維持におけるレチノイドの働きに注目し、RAR、RXRを含むレセプター型転写因子群の働きを分子レベルで解析することによって、脊椎動物の器官・形態形成をになう遺伝プログラムの動態について理解を深めることを目的とした。</p> <p>まずトリRAR<math>\beta</math>プロモーターを単離し、1) このプロモーターの構造・機能が進化の過程で非常に強く保存されていること、2) このプロモーターは神経網膜細胞でRA自身によるポジティブフィードバック制御を受けていること、3) RAによる転写誘導の過程で、脳と神経網膜でのみ特異的に発現しているレセプター型転写因子のTLXタンパク質が関与していること、を明らかにした。</p> <p>当研究グループでの結果から、トリ、ツメガエル胚でTLXタンパク質を強制発現させることによって神経網膜の形態異常を誘導できることが示された。そこで、リガンド未同定のTLXにさらに注目し、ヒトTLX cDNAの単離、構造解析を通してTLXタンパク質が進化的に良く保存されていることを示した。ヒト成人各組織での発現パターンをノザンブロットで解析した結果、TLXの発現は脳でのみ見られ(神経網膜に関しては解析していない)、特に扁桃核・尾状核などの大脳辺縁系組織で強く発現していることが判明した。これらの結果は、TLX遺伝子を欠失したマウスで、主に大脳辺縁系に異常が見られるという報告と一致する。ただしこのマウスでは、眼には特に異常は観察されないことから、TLXの機能を代償できるサブタイプ遺伝子の存在が示唆された。</p> <p>ショウジョウバエでTLXに類似したcDNAが存在することがわかり、この配列をもとにヒトESTデータベースを検索したところTLXに類似しているが明確に異なるcDNA断片(後にPNRと命名)を見いだした。RT-PCR法を用いてヒト細胞株20株をスクリーニングした結果、TLXの発現は7株で認</p>		

められたが、*PNR*は網膜芽腫細胞株Y79でのみ発現を認めた。そこでY79細胞より*PNR*のcDNAを単離した。*PNR*は、DNA結合ドメイン(DBD)の構造がこれまでに知られているレセプター型転写因子とは異なる新しいタイプのものであり、線虫ゲノムデータベース中においても相同なタンパク質をコードする領域が見出された。まず成体での組織分布を解析した結果*PNR*の発現は網膜に特異的であることが判明した。このように発現が極めて特異的であることから、*PNR*が遺伝病に関与している可能性について検討するため、ヒト*PNR*遺伝子を含むP1ゲノムクローンを得て解析を進め、*PNR*遺伝子のコード領域は8つのエクソンからなること、ヒト染色体上で遺伝性網膜疾患の原因遺伝子がマップされている15q24に位置すること、を明らかにした(京都府立医大・谷脇博士との共同研究による)。

次に*PNR*の発現特異性が種間で保存されているかどうかを解析するためトリ8日目胚神経網膜より*PNR*相同遺伝子の単離を試み、鳥類に相同遺伝子が存在すること、胚においても*PNR*が発現していること、を示した。ヒト・トリ*PNR*タンパク質の構造を比較するとDBDの相同性は高いものの、リガンド結合ドメイン(LBD)はかなり異なっている。トリ8日目胚、14日目胚各組織での*PNR*の発現を検討した結果、いずれの場合も神経網膜のみで発現が認められ、網膜色素上皮、水晶体、脳その他の組織では発現が見られなかった。トリ14日目胚で神経網膜は視神経細胞層、双極細胞層、視細胞層に大別できる層構造を形成するが、*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて、神経網膜での発現分布を解析した結果、視細胞層でのみ発現が認められた。発生過程を追って*PNR*と*TLX*の発現時期を比較したところ、*TLX*は4日目には既に強い発現が見られるのに対し、*PNR*は5日目以降、徐々に発現が見られるようになることから、*PNR*が網膜で*TLX*の機能を代償している可能性は低いと考えた。なお、マウス*PNR* cDNAを得て解析した結果、哺乳類でも同様に発現は視細胞層に局限していることが明らかとなった。

次に*PNR*の機能を解析するうえで、その標的配列特異性を明らかにすることを試み、*PNR*はホモ二量体を形成して標的塩基配列に結合すること、その配列は*TLX*の標的配列と類似したものであること、を明らかにした。

以上の結果から、*PNR*は*TLX*に類似した新規のレセプター型転写因子でその遺伝子は線虫からヒトまで保存されており、その発現は鳥類、哺乳類において視細胞に極めて特異的であり、また、視細胞が分化する時期にその発現が上昇すること、標的塩基配列にホモ二量体を形成して結合することがわかった。

網膜視細胞でのみ発現する新たな転写因子*PNR*が脂溶性リガンドに応答し得るレセプター様の構造を持つことは、網膜/視細胞の発現及び機能維持に関わる新たなシグナル伝達系の存在を示唆するものである。現時点では*PNR*のリガンドは不明であるが、色素網膜からはビタミンAを始めとするレチノイドが視細胞へ供給されること、視細胞の分化には色素網膜からのシグナルが必須であることが知られており、*PNR*のリガンド、機能を考察する上で興味深い。本研究から得られた結果は、眼の器官形成、機能維持に重要な新規レセプターサブファミリーの存在を示し、レチノイドとの関わりを考察する上で新たな視点を提供するものである。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 小林 未明

本研究は、眼の器官形成、機能維持におけるレチノイドの働きに注目し、RAR、RXRを含むレセプター型転写因子群の働きを分子レベルで解析することによって、脊椎動物の器官・形態形成をになう遺伝プログラムの動態について理解を深めることを目的とした。

まずトリRAR $\beta$ プロモーターを単離し、1) このプロモーターの構造・機能が進化の過程で非常に強く保存されていること、2) このプロモーターは神経網膜細胞でRA自身によるポジティブフィードバック制御を受けていること、3) RAによる転写誘導の過程で、脳と神経網膜でのみ特異的に発現しているレセプター型転写因子のTLXタンパク質が関与していること、を明らかにした。

ヒトTLX cDNAの単離、構造解析を通してTLXタンパク質が進化的に良く保存されていることを示した。ヒト成人各組織での発現パターンをノザンプロットで解析した結果、TLXの発現は脳でのみ見られ（神経網膜に関しては解析していない）、特に扁桃核・尾状核などの大脳辺縁系組織で強く発現していることが判明した。TLXノックアウトマウスでは、眼には特に異常は観察されないことから、TLXの機能を代償できるサブタイプ遺伝子の存在が示唆された。RT-PCR法を用いてヒト細胞株20株をスクリーニングした結果、TLXの発現は7株で認められたが、PNRは網膜芽腫細胞株Y79でのみ発現を認めた。そこでY79細胞よりPNRのcDNAを単離した。まず成体での組織分布を解析した結果PNRの発現は網膜に特異的であることが判明した。ヒトPNR遺伝子のコード領域は8つのエクソンからなること、ヒト染色体上で遺伝性網膜疾患の原因遺伝子がマップされている15q24に位置すること、を明らかにした。次にPNRの発現特異性が種間で保存されているかどうかを解析するため、トリ8日目胚神経網膜よりPNR相同遺伝子の単離を試み、鳥類に相同遺伝子が存在すること、胚においてもPNRが発現していること、を示した。トリ8日目胚、14日目胚各組織でのPNRの発現を検討した結果、いずれの場合も神経網膜のみで発現が認められた。トリ14日目胚で神経網膜は視神経細胞層、双極細胞層、視細胞層に大別できる層構造を形成するが、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて、神経網膜での発現分布を解析した結果、視細胞層でのみ発現が認められた。発生過程を追ってPNRとTLXの発現時期を比較したところ、TLXは4日目には既に強い発現が見られるのに対し、PNRは5日目以降、徐々に発現が見られるた。なお、マウスPNR cDNAを得て解析した結果、哺乳類でも同様に発現は視細胞層に局限していることが明らかとなった。

以上のように、本論文は網膜に特異的に発現する新規の転写因子PNRをクローニングし、その転写調節機能を明らかにしており、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。