

Title	The Mouse Crx 5'-Upstream Transgene Sequence Directs Cell-Specific and Developmentally Regulated Expression in Retinal Photoreceptor Cells
Author(s)	古川, 晶子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47366
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	ふる かわ あき 子 古 川 晶 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20768 号
学位授与年月日	平成 19 年 1 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	The Mouse <i>Crx</i> 5'-Upstream Transgene Sequence Directs Cell-Specific and Developmentally Regulated Expression in Retinal Photoreceptor Cells (<i>Crx</i> のプロモーター領域は網膜視細胞における <i>Crx</i> 遺伝子の細胞特異的かつ発生時期特異的な発現を制御する)
論文審査委員	(主査) 教授 田野 保雄 (副査) 教授 米田 悦啓 教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

〔目的〕

Crx はホメオボックス遺伝子のひとつで、コードするタンパク質は *Otx* ホメオボックスファミリーに属し、網膜視細胞と松果体細胞に特異的に発現する転写因子である。*CRX* 蛋白は、生体内において、ロドプシンやコーンオプシン、トランスデュシンなどの網膜視細胞や松果体に特異的に発現する遺伝子を活性化する役割を担っている。実際、*Crx* ノックアウトマウスにおいて、多くの視細胞特異的な遺伝子群の発現が低下している。人において、*Crx* の変異は錐体杵体ジストロフィー、網膜色素変性症、レーベル先天盲などの失明の原因となる 3 つのタイプの遺伝性網膜変性疾患の原因となることが明らかとなっている。したがって、*Crx* は視細胞の正常な分化と維持に必須である。

網膜視細胞における *Crx* の発現制御の分子機構を解明するため、トランスジェニックマウスを作成して *Crx* プロモーター領域の解析を行った。

〔方法ならびに成績〕

Crx 遺伝子の 5' 上流域 12 kb または 5' 上流域 2 kb+3' 下流域 10 kb の flanking sequence と β -galactosidase (*lacZ*) レポーター遺伝子を結合して作成したトランスジェニックマウスを作成し、網膜を X-gal 染色し、プロモーター/エンハンサー活性について解析した。

両方のコンストラクトのトランスジェニックマウスの複数のラインで網膜視細胞と松果体細胞に *lacZ* の発現がみられた。E12.5 に将来の視細胞層に発現が認められ、発生が進むにつれ、視細胞層での発現が増し、成体の視細胞層でも発現が観察された。

さらに、その発現を細胞レベルで検証するために、分離した網膜の各細胞を抗 *lacZ* 抗体と各種網膜細胞 (杆体、錐体、双極細胞、Muller-glia、アマクリン細胞) に対するマーカーとなる抗体とを用いて二重染色することによって *lacZ* が網膜視細胞である杆体細胞と錐体細胞にのみ発現していることを確かめた。以上のことから、*lacZ* 陽性の発現パターンは網膜発生における *Crx* 発現パターンと時間空間的に一致していた。

また、*Crx* ノックアウトマウスと今回のトランスジェニックマウスをかけ合わせ、野生型、*Crx* ヘテロ、*Crx* ホモ

のバックグラウンドで β -galactosidase (lacZ) の活性を調べると、Crx ヘテロ、Crx ホモにおいては野生型のそれぞれ 57%、31%となり、Crx の遺伝子数依存性が認められた。

[総括]

今回の実験結果より、網膜視細胞において Crx の 5'-上流の 2 kb プロモーター領域が細胞特異的かつ発生時期特異的に Crx の発現を再現することに十分であることが示された。Crx-/-のバックグラウンドでも lacZ 活性は減少するものの 0 にはならず、野生型と同じく胎生 12.5 日目において lacZ が発現し始めることから、Crx 自身は初期の Crx 転写活性化に必須ではないことが示唆され、Crx のプロモーター領域に Crx を活性化する未知の因子(群)があるとされる。そして、これらの因子によって一旦 Crx の転写が開始されると分化した視細胞では正のフィードバックにより Crx 自身が自己の発現を維持していると考えられる。そして、Crx 蛋白質がオプシンやトランスデュースインを含む種々の網膜視細胞特異的な遺伝子を活性化することによって、視細胞の分化を司っていると考えられる。

また、Crx ノックアウトマウスでも視細胞特異的分子の中には低下しても完全に消失しないものが複数あることから、Crx と機能重複する因子が存在すると考えられる。

今後 Crx を活性化する未知の因子(群)を解析、同定することが Crx 遺伝子の制御機構や、網膜細胞の運命決定のメカニズムを解明するのに非常に重要と考えられる。また、Crx は網膜発生において視細胞の最も初期のマーカーであり、Crx プロモーターは視細胞の発生や機能に関するさまざまな研究において非常に有用なツールになると思われる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、網膜視細胞の正常な分化と維持に必須である遺伝子 Crx の網膜視細胞における転写発現制御機構を解明するため、Crx 遺伝子の上流域 12 kb または 2 kb + 下流域 10 kb と lacZ レポーター遺伝子を結合したコンストラクトを用いたトランスジェニックマウスを作成し解析したものである。胎生 12.5 日目以降成体にいたるまで杯体細胞と錐体細胞に lacZ の発現が認められ、発現パターンは網膜発生における Crx 発現パターンと一致していた。

また、Crx ノックアウトマウスと今回のトランスジェニックマウスをかけ合わせ、野生型、Crx ホモのバックグラウンドで lacZ の活性を調べると、Crx ホモにおいては野生型の 31%の活性となり、Crx の遺伝子数依存性が認められた。

本研究より、網膜視細胞において Crx の上流 2 kb のプロモーター領域が細胞特異的かつ発生時期特異的に Crx の発現を再現することに十分であることが示された。

Crx ホモバックグラウンドにおいても lacZ 活性は減少するものの 0 にはならず、野生型と同じく胎生 12.5 日目に lacZ が発現し始めることから、Crx のプロモーター領域に Crx を活性化する別の因子があると思われる。そして、一旦 Crx の転写が開始されると分化した視細胞では正のフィードバックにより Crx 自身が自己の発現を維持し、Crx 蛋白質が視細胞特異的な遺伝子を活性化することによって、視細胞を最終分化させる。

Crx を活性化する因子を解析、同定することが網膜細胞の運命決定機構を解明するのに重要と考えられる。また、Crx は網膜発生において視細胞の初期のマーカーであり、Crx プロモーターは視細胞の発生や機能に関する研究において非常に有用なツールになると思われる。以上より、本研究は学位に値する業績と認められる。