

脂溶性ビタミン/ホルモンに対する細胞応答機構の調節

Regulation of Cellular Responses to
Lipophilic Vitamins and Hormones

(研究プロジェクト番号: JSPS-RFTF 96L00309)

プロジェクトリーダー

稲葉 カヨ 京都大学大学院生命科学研究科・教授

コアメンバー

橋本 主税 京都大学大学院生命科学研究科・助手

原 健二 京都大学大学院生命科学研究科・助手

Felix Grun 京都大学大学院生命科学研究科・リサーチアソシエイト

Ruth T Yu 京都大学大学院生命科学研究科・リサーチアソシエイト

安田 國雄 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科・教授

1. 研究目的

一群の脂溶性ホルモンや活性型ビタミンは、核内レセプターに対する特異的リガンドとして機能し、標的遺伝子の転写を制御する。また、これまでに見いだされている核内レセプターの約半数がリガンド未同定のオーファンレセプターであり、その生理作用については多くの部分が不明である。核内レセプターを経由するシグナル伝達経路は、内分泌学・栄養学的な知見を遺伝子発現制御の観点から解明するだけでなく、転写因子を標的とする薬剤の作用点、また、外因性内分泌攪乱物質の作用点として重要である。本研究は、核内レセプターを経由する細胞シグナリングについて、分子機構の解析を目的としている。

- (1) 核内レセプターの遺伝子認識特異性の解明と転写制御機構の解析
- (2) 遺伝子破壊マウスの解析による、個体レベルでのレセプター機能の解析
- (3) 網膜分化における変異レセプター遺伝子の機能解析
- (4) ビタミン A 代謝酵素遺伝子の発現制御機構の解析

2. 研究成果概要

2.1 核内レセプターの遺伝子認識特異性の解明と転写制御機構の解析

網膜を含む前脳領域特異的に局在がみとめられるオーファンレセプター Tlx 産物の DNA 結合ドメインに VP16 の転写活性化ドメインあるいは Engrailed 2 の転写抑制ドメインを結合させた解析から、Tlx は強い転写抑制能を有する DNA 結合因子であることが明らかとなった。さらに、Tlx は paired タイプのホメオボックス因子である Pax 2 遺伝子のプロモーター領域に *in vivo* および *in vitro* において直接結合することが明らかとなった。また Tlx の発現によって Pax 2 遺伝子の転写が特異的に制御されることを見だし、Pax 2 が Tlx の標的遺伝子であることが明らかとなった。

2.2 遺伝子破壊マウスの解析による、個体レベルでのレセプター機能解析

オーファンレセプター Tlx の個体発生レベルでの機能解析を目的とし、Tlx ノックアウトマウスを作成し、眼での発現に注目して解析を行った。結果は、Tlx を欠損したマウスでは、失明をともなう視神経や網膜組織の著しい退縮が生じることから、Tlx が眼の形成過程において重要な機能を有することが明らかとなった。

2.3 網膜分化における変異レセプター遺伝子の異所的発現実験

Tlx の標的配列のサブセットを認識する、Tlx と構造的および機能的に高い相同性を有する新規核内レセプター PNR 遺伝子を単離・同定した。この遺伝子は、網膜の視細胞にのみ特異的に発現が認められた。転写抑制型および転写活性型 PNR の機能解析から、PNR は抑制型転写因子であることを明らかとした。またレトロウイルスベクターおよびエレクトロポレーション法の併用によって PNR 遺伝子を強制発現したニワトリ網膜では、網膜神経層の形成が著しく阻害された。

2.4 ビタミン A 代謝酵素遺伝子の発現制御機構

眼の背腹軸形成にレチノイン酸 (RA) が重要であることが知られている。眼では RA が背側に比べ腹側により高濃度で存在する事実は、RA 合成に関わる酵素 (ADH および ALDH) が眼の腹側に特異的に発現している可能性を示唆する。しかし既知のニワトリ ALDH は腹側特異的な発現が認められない。今回、網膜発生の初期から腹側網膜特異的に発現している新しい RA 合成酵素 (ヒト ALDH 6 と高い相同性 (86%) をもつ) を単離・同定した。このニワトリ ALDH 6 は、RA レポーター遺伝子を使ったトランスフェクション実験により、高い RA 合成能を持つことが明らかとなった。これらのことからニワトリ ALDH 6 は、RA 腹側特異的な局在に大きく貢献していることが示唆された。さらに、ニワトリ ALDH 6 の転写産物の発現を詳細に解析した結果、中脳と後脳の境界部分、ラトケ囊、耳胞、肢芽の指間部、鼻原基、

介在ニューロンなどにも発現していることが明らかとなった。

2.5 その他

核内レセプターの挙動を調べるために Green Fluorescence Protein (GFP)の変異体を作成し、37 °Cでも安定に、また細胞種に依存せず強力な蛍光を発するプラスミド AGFP を作成した。AGFP は高等動物個体や培養細胞で利用できるため、現在多数の国内外の研究者が利用している。また、この AGFP プラスミドの発現が蛍光顕微鏡下で容易に観察できることを利用して、動物個体特にニワトリ胚に時期と組織特異的に遺伝子を導入できる microelectroporation 法を開発した。この方法は、個体レベルにおいて遺伝子機能を解析できる極めて優れた方法であり、国内外から多くの研究者が microelectroporation 法を習得に来ている。特に、眼の形態形成過程における遺伝子機能の解明に多大の貢献をしている。

3. 結論

本研究は、GFP を蛍光強度の強い蛋白質 AGFP に改良し、融合蛋白質の動態を詳細に解析できる実験系を構築し、従来の手法では検討できなかった細胞レベルでの経時的、空間的なホルモンシグナリングの解析を可能にした。さらに、この系を用いて、細胞外からのシグナルが細胞質や核内で転写応答へと誘導されるその過程を示し、転写の活性化や抑制を行う領域を特定することに成功した。さらに、AGFP の作成から、種々の遺伝子との融合遺伝子を作成し、その分子の挙動を生細胞あるいは個体レベルで可視化できること手法を確立したことは、分子生物学、発生生物学、細胞生物学の研究分野に新しい手法と研究視点を提供した。このことから、シグナル伝達、遺伝子発現制御などの分子機構の解明に新しい研究方法を提供した。

主な発表論文

- (1) Kobayashi, M., etc., "Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **96** (1999) 4814-4819
- (2) Momose, T., etc., "Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation," Dev. Growth. Diff., **41** (1999) 335-344
- (3) Okamoto, K, et al., "Redox-dependent regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor," J. Biol. Chem., **274** (1999) 10363-10371
- (4) Yu Ruth T., etc., "The orphan nuclear receptor Tlx regulates Pax2 and is essential for vision," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **97** (2000) 2621-2625
- (5) Kobayashi, M., etc., "Cell-type-specific regulation of the RAR mediated by the orphan nuclear receptor TLX," Mol. Cell. Biol., **20** (2000) 8731-8739