

機関番号：34315

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2008～2010

課題番号：20590079

研究課題名（和文） 網膜視細胞発生における転写調節機構の解析

研究課題名（英文） The regulatory mechanisms of retinal photoreceptor development

研究代表者 小池千恵子 (Chieko Koike)

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：80342723

研究成果の概要（和文）：

マウス Crx の発現は網膜視細胞の発生パターンと時空間的に一致することが明らかとなっている。申請者らは Crx のプロモーター解析より、Crx の視細胞特異的発現を誘導する 14bp の配列（CUE 配列）を Crx 遺伝子上流近傍より同定した。CUE 配列のみを欠損しているプロモーターを用いてトランスジェニックマウスを作製したところ、網膜視細胞および松果体での LacZ の発現が消失したことから、CUE 配列は Crx 発現に必要な配列であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We performed transgenic mice based promoter analysis to identify which sequence determines the restricted Crx expression. We identified 14bp sequence, named as CUE sequence, in the proximal region of Crx promoter that is required for the specific expression of Crx in photoreceptors. The lack of CUE sequence in Crx promoter resulted in disappearance of lacZ expression in the photoreceptor and pineal gland.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物系薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：

発生分化 神経科学

1. 研究開始当初の背景

網膜の細胞運命決定メカニズムは 1990 年代後半までほとんど未知であった。しかしながら、視細胞特異的転写因子 Crx (Corn-Rod homeobox gene) の発見がきっかけとなり説明が進みつつある。Crx は *otd/Otx* ホメオボックス遺伝子ファミリーに属する転写因子であり、その発現は網膜視細胞（錐体、桿体細胞の両方）および松果体に限局している。Crx の標的としては、ロドプシン、錐体オプシン、

桿体および錐体トランスデュシン、桿体および錐体アレスチン、 γ -フォスフォリエステラーゼなどが明らかとなっており、Crx はこれらの光受容体特異的遺伝子の制御配列に結合して転写を活性化する。Crx の変異マウスでは、桿体、錐体ともに電気生理学的機能が完全に消失する（すなわち盲目である）。

Crx は視細胞特異的に最も早く発現する転写因子であり、その発現は視細胞の発生パターンと時空間的に一致することが明らかと

なっている。最近、Crxの発現は転写因子Otx2により制御されることが明らかとなった。Otx2の視細胞特異的ノックアウトマウスを解析した結果、Otx2の発現が消失するとCrxの発現も完全に消失することなどから、Otx2がCrxの上流因子として働くことが明らかとなった。また同マウスでは視細胞に分化する予定の細胞はアマクリン細胞に運命変換することが明らかとなり、Otx2が視細胞形成のマスター遺伝子であることが明らかとなった。Otx2の発現パターンは広い範囲におよび、胎生期においては胚盤葉上層(epiblast)、発生後も前脳、中脳に発現が認められる。眼においても発現は視細胞に局限しておらず、網膜色素上皮および網膜双極細胞などに発現が認められる。最近我々は、Otx2が網膜視細胞の運命決定のみならず成熟にも関与すること、さらに網膜双極細胞においては、成熟に重要な役割を果たすことを明らかにした(Koike, et al. Mol. Cell. Biol., 2007)。このようにCrxの上流因子であるOtx2は視細胞の発生以外にも重要な役割を果たし、その発現は広範囲に及ぶことから、Crxの発現を網膜視細胞と松果体に局限してその発現は広範囲に及ぶことから、Crxの発現を網膜視細胞と松果体に局限している上流因子がOtx2以外にも存在している可能性が高い。

2. 研究の目的

視細胞以外で抑制的に働くのではないかと考えられるCUE配列の性質を明らかにするとともに、CUE配列に結合する因子の同定を行うことによりCUE配列結合因子がCUE配列に結合してCrxの特異的発現を誘導するメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

視細胞特異的遺伝子発現におけるCUE配列の意義をトランスジェニックマウスを作成することにより解析する。さらにCUE配列結合因子の機能については胎児期における個体全体での発現パターンをin situハイブリダイゼーションや抗体作成を行って免疫染色で解析し、網膜発生過程における詳細な発現パターンを解析する。最終的にはCUE配列結合因子の遺伝子ノックアウトマウスを作成し解析を行う。

4. 研究成果

Crxのプロモーター解析より、Crxの視細胞特異的発現を誘導する14bpの配列(CUE配列)をCrx遺伝子上流近傍より同定した。CUE配列を変異させたCrx変異プロモーターの下流にLacZレポーター遺伝子を組み込んだト

ランスジェニックマウスを解析した結果、完全なCrxプロモーターによる制御下ではLacZの発現が網膜視細胞および松果体に局限しているのに対し、CUE配列領域が変異しているプロモーターの下流でレポーター遺伝子が発現するようなトランスジェニックマウスでは視細胞以外に発現がみられた。そこでCUE配列のみを欠損しているプロモーターを用いてトランスジェニックマウスを作製したところ、網膜視細胞および松果体でのLacZの発現が消失したことから、CUE配列はCrx発現に必要な配列であることを示唆する結果を得た。今後は新規Yeast One Hybrid法により結合する因子についての解析および、CUE配列に結合する網膜中のタンパク質の同定を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

- 1) 著者名 Makoto Nakamura, Rikako Sanuki, Tatsuhiro R. Yasuma, Akishi Onishi, Koji M. Nishiguchi, Chieko Koike, Mikiko Kadowaki, Mineo Kondo, Yozo Miyake, Takahisa Furukawa. 論文標題 TRPM1 mutations are associated with the complete form of congenital stationary night blindness. 査読: 有 雑誌名 *Mol. Vis.* 16:425-37 (2010).
- 2) 著者名 Chieko Koike, Tomohiro Numata, Hiroshi Ueda, Yasuo Mori, Takahisa Furukawa. 論文標題 TRPM1: A vertebrate TRP channel responsible for retinal ON bipolar function. 査読: 有 雑誌名 *Cell Calcium(Review)*. 48(2-3):95-101 (2010)
- 3) 著者名 Sanuki R, Omori Y, Koike C, Sato S, Furukawa T. 論文標題 Panky, a novel photoreceptor-specific ankyrin repeat protein, is a transcriptional cofactor that suppresses CRX-regulated photoreceptor genes. 査読: 有 雑誌名 *FEBS Lett.* 19;584(4):753-8 (2010)
- 4) 著者名 Chieko Koike, Takehisa Obara, Yoshitsugu Uriu, Tomohiro Numata, Rikako Sanuki, Kentaro Miyata, Toshiyuki Koyasu, Shinji Ueno, Kazuo Funabiki, Akiko Tani, Hiroshi Ueda, Mineo Kondo, Yasuo Mori, Masao Tachibana, Takahisa Furukawa. 論文標題 TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. 査読: 有 雑誌名 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(1) 333-337 (2010, Epub 2009)
- 5) 著者名 小池千恵子, 古川貴久 論文標

題:網膜視細胞の細胞極性と細胞内オルガ
ネラの制御 外節形成、繊毛内輸送、核の
ポジショニングから網膜変性症まで -
査読:無 雑誌名生化学 80 p224-232 (2008)

〔学会発表〕(計9件)

- 1) 発表者名: 山岡昭士、末次志郎、小池千恵子、発表標題: マウス網膜発生過程における IRSp53 の発現機能解析 学会名: 日本薬学会第131年会 発表年月日: 2011年3月29日(地震のため中止・学会は成立) 発表場所: 静岡県立大学(静岡県)
- 2) 発表者名: 多賀 駿、殿村 涉、寺前 彰二、小西 聡、小池 千恵子 発表標題: 三次元マイクロプローブ電極アレイを用いたマウス網膜光応答解析 学会名: 日本薬学会第131年会発表年月日: 2011年3月29日(地震のため中止・学会は成立) 発表場所: 静岡県立大学(静岡県)
- 3) 発表者名: 遠藤 拓真、上田 祐輔、多賀 駿、古川 貴久、小池 千恵子 発表標題: 網膜 ON 型双極細胞の視覚伝達チャンネル TRPM1 の発現メカニズム解析 学会名: 日本薬学会第131年会 発表年月日: 2011年3月30日(地震のため中止・学会は成立) 発表場所: 静岡県立大学(静岡県)
- 4) 発表者名: W.Tonomura, S.Taga, C.Koike, S.Konishi 発表標題: Electoretinogram recordings inside isolated mouse retina using spatially arranged microelectrodes 学会名: 国際ワークショップ 発表年月日: 2011年3月4日 発表場所: 東京大学武田ホール(東京都)
- 5) 発表者名: Ying Xu, Marie Fina, Chieko Koike, Takahisa Furukawa, Noga Vardi 発表標題: Rod bipolar cells in mGluR6-null mice are hyperpolarized 学会名: Society for Neuroscience 発表年月日: 2010年11月17日 発表場所: San Diego(U.S.A)
- 6) 発表者名: Chieko Koike, Tomohiro Numata, Hiroshi Ueda, Mineo Kondo, Masao Tachibana, Takahisa Furukawa 発表標題: The function of mouse and human TRPM1 学会名: FASEB meeting 発表年月日: 2010年7月21日 発表場所: Vermont(U.S.A)
- 7) 発表者名: Chieko Koike, Tomohiro Numata, Hiroshi Ueda, Mineo Kondo, Masao Tachibana, Takahisa Furukawa 発表標題: TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel 学会名: The American Society of Cell Biology 発表年月日: 2010年12月13日 発表場所: Philadelphia(U.S.A)
- 8) 発表者名: 小池千恵子 発表標題: 網膜 ON 型双極細胞の視覚伝達チャンネル TRPM1 学会名: 第157回大阪大学 生物科学セミナー

発表年月日: 2010年6月9日 発表場所: 大阪大学(大阪府)

9) 発表者名: Chieko Koike, Tomohiro Numata, Hiroshi Ueda, Mineo Kondo, Masao Tachibana, Takahisa Furukawa 発表標題: TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel 学会名: Society for Neuroscience 発表年月日: 2009年10月21日 発表場所: Chicago(U.S.A)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 千恵子 (KOIKE CHIEKO)
立命館大学・薬学部・准教授
研究者番号: 80342723

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: