

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

小林 未明

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子発生生物学講座

(安田 國雄 教授)

平成11年1月7日提出

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RARβ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)、特に扁桃体・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限局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。

目次

1. 序論	
1.1	ビタミンAとレチノイン酸作用の多様性..... 3
1.2	レセプター型転写因子を介したホルモン・ビタミン作用機構の相同性..... 5
1.3	レチノイン酸レセプター..... 8
1.4	オーファンレセプター..... 10
1.5	TLX..... 10
1.6	本研究の流れ..... 11
2. 材料と方法	
2.1	動物細胞培養..... 13
2.2	FBS中脂溶性物質の除去..... 13
2.3	レポーター遺伝子を用いた転写活性の測定..... 13
2.4	動物個体、培養細胞からのRNA抽出..... 14
2.5	RT-PCR..... 14
2.6	cDNAの単離..... 14
2.7	遺伝子の単離..... 16
2.8	サザン・ノザンハイブリダイゼーション..... 16
2.9	ゲル移動度シフト法..... 17
2.10	プラスミドの構築..... 17
別表1.	本研究で用いたオリゴヌクレオチド..... 19
別表2.	本研究で用いた細胞株..... 20
3. 結果	
3.1	TLXによるRAR β 2プロモーターのRA応答性制御..... 21
3.2	ヒトTLXの同定と機能解析..... 33
3.3	新規核内レセプターPNRの同定..... 43
3.4	トリ・マウスPNRの同定と発現解析..... 56
3.5	PNRの標的配列特異性..... 70
4. 考察	
4.1	脊椎動物におけるRAR β 遺伝子転写機構の保存..... 78
4.2	細胞種特異的なRAR β 遺伝子の転写調節..... 79
4.3	TLXによるRAR β 遺伝子の転写調節機構..... 80
4.4	成体におけるTLXの発現と機能..... 83
4.5	新規核内レセプターPNRの同定..... 84
4.6	PNRの発現特異性..... 84
4.7	視細胞におけるPNRの機能..... 85
5. 謝辞 88
6. 参考文献 89

1. 序論

1.1 ビタミンAとレチノイン酸作用の多様性

脂溶性ビタミンとして、ビタミンAと名づけられた因子が発見されたのは20世紀初頭のことである。森正道によって1896年に発表された論文がビタミンAの存在を示すおそらく最初の論文であり、後に、脂肪中に存在する未知の不可欠栄養素としてビタミンAの名がDrummondによって提唱されたのは1920年のことである。動物体内でのビタミンAの作用に関する知見は、ビタミンA及びその前駆体となりうるカロチノイドを含まない飼料を与えた動物に起こる症状の観察を基礎にして得られた。その第一の症状は成長の停止であり、続いて体重の減少である。視物質の形成不能を原因とする夜盲症の他、癌の発生を高めることも指摘されている。さらに、雄のラットでは精子の形成が停止し、雌では胎盤に病変が起こり胎児の吸収が起こる。1970年代にはマウスに腫瘍を移植するモデル実験から腫瘍免疫にも関係することが示された。

ビタミンAの化学的実体を代表する分子はレチノールである。視覚作用に関してはアルデヒド型のレチナールが重要であるが、他の作用についてはカルボン酸誘導体であるレチノイン酸(RA)が活性型ビタミンAとして機能する(図1.1)。RAがビタミンA欠乏動物の成長を回復させるということは1946年に至ってArensとvan Dorpによって報告され、RAの重要性が初めて認識された。1978年、低濃度のRAを投与することで胚性癌細胞F9の分化が誘導されること(Strickland et al., 1978)が報告された。さらに1980年にはヒト前骨髄球性白血病細胞HL-60がRA添加によって成熟顆粒球へ分化(Breitman et al., 1980)することが報告され、RAの白血病治療薬としての可能性が開かれた。実際RAが前骨髄球性白血病に対して著効を示すことが明らかとなり(Huang et al., 1988)、医薬品化学の領域においても最も期待される化合物のひとつとなった。

RAの動物形態形成に対する作用として、1987年Thallerらはトリ肢芽を用いた実験系で、RAをモルフォゲンとして報告した(Thaller et al., 1987)。モルフォゲンとは極性化活性帯(ZPA: zone of polarizing activity)から放出され、拡散によって形成される濃度勾配が位置情報を提供するような分子として存在が想定された(Wolpert 1969)ものである。さらに、イモリではRAによって切断肢の再生の際に奇形が生じること(Maden, 1980)や、他の脊椎動物でもRAを投与すると胚発生の時期に依存して、頭部、眼(Hyatt et al., 1996)、脊椎、肢芽(Tickle et al., 1982)などに強い催奇性を示すことが発見された(Shenefelt, 1972; Rutledge et al., 1994)。1991年になってRAはモルフォゲンそのものではないことを示唆する結果(Wanek et al., 1991; Noji et al., 1991)が報告されたが、これらの発見は、RAが広く細胞の増殖・分化を制御するシグナル分子として機能しうる重要な化合物であることを物語っている。こういった結果から、ビタミンAの作用経路と遺伝子発現調節の関係には大きな関心が寄せられたが、その研究の端緒となったのはステロイドホルモンの研究であった。

1.2 レセプター型転写因子を介したホルモン・ビタミン作用機構の相同性

細胞間シグナル伝達に重要な役割を果たすホルモン、増殖因子、神経伝達物質の多くは、膜に結合した受容体タンパク質のリガンドとして機能し、リン酸化酵素のカスケードやセカンドメッセンジャーを介して細胞内部へと順次シグナルを転送する。しかし、1950年代から60年代にかけて、放射性標識されたエストロゲンを用いた実験から、ステロイドのレセプターが標的器官細胞の膜ではなく、可溶性画分に存在することが明らかにされ、1966年には細胞質でホルモンに結合したレセプターが高次構造変化を起こし、核へ移行してmRNAの合成を促進するという説がJensenによって提唱された(図1.2)(Jensen et al., 1966)。この説は、ステロイドレセプターがリガンド結合に依存した転写調節因子として機能するという概念を捉えたものとして重要である。1985年から1986年にかけてR. Evans とP. Chambonらのグループによって糖質コルチコイドレセプター(Hollenberg et al., 1985)、エストロゲンレセプター(Green et al., 1986)のcDNAが単離され、レセプタータンパク質の一次構造が初めて明らかとなった。これらのレセプターは同時に転写因子としての機能を併せ持ち、膜上に存在するレセプターに対して、核内レセプターと呼ばれる。核内レセプター群は、初期には既知のリガンドに結合するレセプターというアプローチで同定されたが、核内レセプター様の構造を持つプロトオンコジーン*c-erb-A*のリガンドが甲状腺ホルモンであること(すなわち*c-erb-A*が甲状腺ホルモンレセプターそのものであること)がわかり、その後はcDNAの相同性を指標にしてレセプターをクローニングし、それに対してリガンドを検索していくという方法論が展開された(Sap et al., 1986; Weinberger et al., 1986)。同様のアプローチによってRAの核内レセプターも同定され、現在RAR(レチノイン酸レセプター)(Petkovich et al., 1987; Giguere et al., 1987)とRXR(レチノイドXレセプター)(Levin et al., 1992; Heyman et al., 1992)の2つが知られている。今日では脊椎動物で約50の核内レセプターが同定され、その多くはリガンド未同定のいわゆるオーファンレセプターである(Mangelsdorf et al., 1995; Mangelsdorf and Evans, 1995)。

核内レセプターのDNA結合領域(DBD)は約80アミノ酸残基からなり、二つのZnフィンガーモチーフが並列した特徴的な構造を持つ(図1.3)。標的塩基配列の認識にはDBDの中でも特にP box、D boxを構成するアミノ酸が重要であり、P boxの違いによって、標的配列の基本結合モチーフを識別する(Umesono and Evans, 1989)。標的配列は通常この基本結合モチーフが反復(ダイレトリピート:DR)、あるいは回文様(パリンδροーム)に並んだ構造を持つ。このような標的配列は、ステロイドホルモンや甲状腺ホルモン、活性型の脂溶性ビタミン(レチノイン酸、ビタミンD₃)といった脂溶性低分子に応答して転写調節を受ける遺伝子のプロモーター領域に見出され、ホルモン応答性配列(HRE)と呼ばれている。核内レセプターは、C末端側に同定されたりガンド結合領域(LBD)にリガンドが結合することによって立体構造に変化を起こし、クロマチンの特定の部位に強く結合

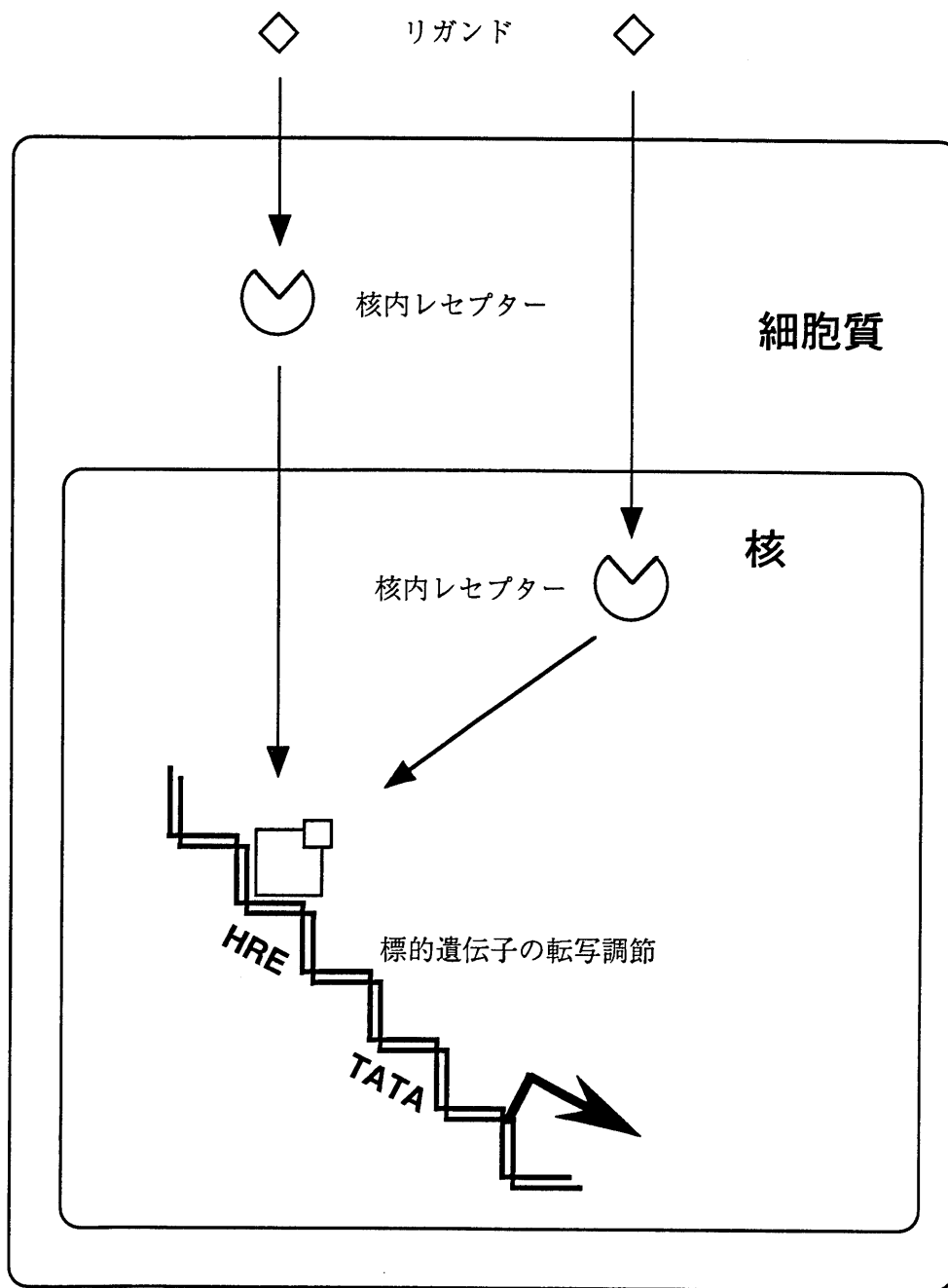
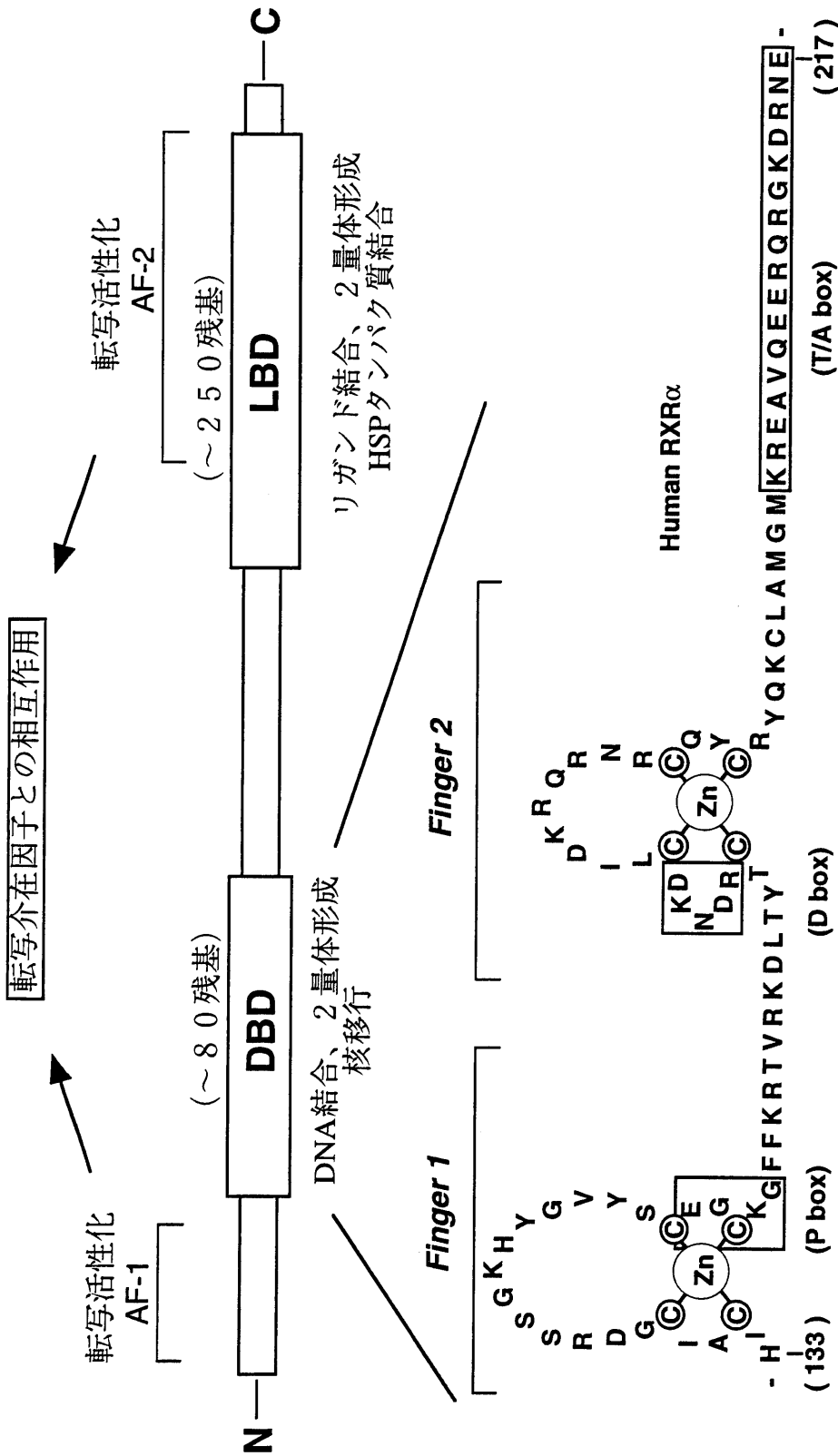


図 1.2 レセプター型転写因子（核内レセプター）の作用機構



レセプター	P box	結合基本モチーフ
Type I (GR, AR)	GCKV	AGAACA
Type II (RAR, TR)	EGCKG	AGGTCA
TLX	DGCSG	AAGTCA

図1.3 核内レセプターのドメイン構造

して、特異的な遺伝子の発現を誘導したり抑制したりすることが明らかとなっている (Chen H. et al., 1997)。

このように、従来ホルモン、ビタミンという別々の概念で捉えられてきた脂溶性低分子が、核内レセプターを介して標的細胞における遺伝子発現のパターンを直接制御しており、その作用機構に関しては類似の仕組みを持つことが明らかとなってきた。なお、核内レセプターは酵母や植物からは見出されておらず、多細胞動物に特有な転写因子ファミリーと考えられており、系統進化的な側面からより広範な動物種にわたっての解析も進められている (Escriva et al., 1997)。

1.3 レチノイン酸レセプター

RAR、RXRにはそれぞれ α 、 β 、 γ と呼ばれる3種のサブタイプ遺伝子が存在する。各遺伝子は9~11のエキソンに分断されており、ヒト染色体上では、17q21.1 (RAR α)、3p24 (RAR β)、12q13 (RAR γ)、9q34.3 (RXR α)、6q21.3 (RXR β)、1q22-23 (RXR γ)にマップされている。どの遺伝子も個体発生の初期から発現しており、成体ではRAR α とRXR β は普遍的な発現パターンを示す。RAR β とRXR α の発現はより組織特異的であるが、RAR γ (肺、皮膚)、RXR γ (筋肉、心臓)ほど限局していない。ヒトやマウスのRAR遺伝子群にはいずれもプロモーターが2つあり、RAR α 2、 β 2、 γ 2プロモーターはRA自身によって誘導される。RXR α 、 β 、 γ 遺伝子からも5'端の異なるmRNA(それらは互いにアイソフォームと呼ばれる)が検出され、発現様式は複雑である。mRNA分子種の多様性を反映して、N末端の異なる多くのRARタンパク質 (α 1、 α 2、 β 1、 β 2、 β 3、 β 4、 γ 1、 γ 2)、RXRタンパク質 (α 1、 α 2、 β 1、 β 2、 γ 1、 γ 2)が合成される。しかしそれらの機能の違いはまだはっきりしていない。RAには種々の立体異性体が存在するが、レセプターに直接結合する主要な分子はall-trans-RA (at-RA)、9-cis-RAである (図1.2)。RAR群はat-RA、9-cis-RAとともに認識するが、RXR群は9-cis-RAのみを受容する。RAR特異的な合成リガンドとしてはTTNPB((E)-4-[2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)propen-1-yl]benzoic acid)、Am80(4-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenylcarbamoyl)benzoic acid)などがあり、LG69(4-{1-(3,5,5,8,8-pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthyl)-1-ethenyl}benzoic acid)などはRXRに特異的である。天然のビタミンA誘導体に加えて、同様の生物活性を示すこれらの合成化合物群を総称してレチノイドと呼ぶ (Sporn et al., 1994)。

RXRはホモ二量体を形成し、AGGTCAというモチーフが1つの塩基を挟んで同方向に並んだ反復構造(DR1)を特異的に認識して結合する。一方RARはそれ自身では弱いDNA結合能しか示さず、RXRとヘテロ二量体を形成して、RA応答性配列(RARE; 典型的にはDR5またはDR2構造からなる)を認識し、5'側にRXRが、3'側にRARが結合する (Perlmann et al., 1993; Kurokawa et al., 1995)。RARは、レチノイド結合タンパク質として





RARβ2	AG  GGTTC A CCGAA  AGTTC A CT
RARα2	CG AGTTC A GCGAG AGTTC A GC
RARγ2	CC GGGTCA GCAGG AGGTGA GC
CRABPII	GG GGGTCA TTGGA AGGACA AG
ADH3	AG GGGTCA TTCAG AGTTC A GT
mCP-H	GC AGGTCA CTGAC AGGGCA TA
MK	AG AGGTCA GGAAC CGGGCA GG
mTGase	AG AGGTCC CAGTG GGGTCA GG
tPA	TG GGGTCA CCCTG GGGTCA GA
HOX A1	CA GGTTC A CCGAA AGTTC A AG
HOX A4	CG AGGTGA ACTTC AGGTCA GT
mHOX B1	CT GGTTC A TAGAG AGTTC A GC
HOX D4	TA AGGTGA AATGC AGGTCA CA
zSHH	AT GGTTC A TTAGC GGGTCA CA
5	
mCRBPI	GT  AGGTCA AA  AGGTCA GA
mCRABPII-1	CC AGTTC A CC AGGTCA GG
mVL30-1	G AGGTAA AA AGTTC A TG
mVL30-2	TG GGGTGA AA AGTTTA GG
APO A1	AG GGGTCA AG GGTTC A GT
mHOX B1	CG AGGTAA AA AGGTCA GC
2	

図 1.4 レチノイン酸応答性配列

RARとRXRのヘテロ二量体が認識するDNA塩基配列は、多く"AAGTCA"が並列した構造を持ち、RAによって直接転写誘導を受ける遺伝子の制御領域に存在する。図中、小文字で示したmはマウス遺伝子、zはゼブラフィッシュの遺伝子であり、他はヒトの遺伝子に由来する。CRABP:細胞内RA結合タンパク質、ADH:アルコール脱水素酵素、CP-H:補体因子H、MK:ミッドカイン、TGase:グルタミン酸転移酵素、tPA:組織プラスミノゲン活性化因子、SHH:ソニックヘッジホッグ、CRBP:細胞内レチノール結合タンパク質、VL30:レトロトランスポゾン、APO A1:アポリポタンパク質A1。

橋本らによって精製されているが、この時のタンパク質の大きさは95kDと推定されており、RARが*in vivo*でも二量体を形成して機能することを支持する(Hashimoto et al., 1988)。RAREを持つ標的遺伝子には、RAR自身や細胞内レチノイド結合タンパク質(CRABP, CRBP)群、ホメオボックス(HOX)遺伝子群などがある(図1.4)。RAR・RXRは、リガンドが結合しているいないに関わらず核内に存在し、リガンドが結合していない状態では、SMRT(Chen and Evans, 1995; Horlein et al., 1995)などの抑制因子と結合しており、リガンドが結合すると同時に抑制因子から解離して、転写活性化因子と結合し、標的遺伝子の転写を活性化するというモデルが提唱されている(Beato et al., 1995)。

1.4 オーファンレセプター

現在知られているオーファンレセプターは大きく分けて、RXRをパートナーとしてヘテロ二量体を形成するものと、そうでないものの2つに分類できる(Mangelsdorf and Evans, 1995)。前者については、RARやペルオキシゾーム増殖剤応答性レセプター(PPAR)などが含まれ、リガンドが存在する場合が多い。一方RXRと相互作用しないグループは、その相同遺伝子がショウジョウバエや線虫にも見出せるという特徴を持つ。これらのオーファンレセプターは、リガンド既知のレセプターに比較して、部位、時期に特異的な発現パターンを示すものが多く、その標的細胞での発現が必須であることが遺伝子破壊マウスなどの実験を通して明らかにされている(原ら, 1998)。また、これらのオーファンレセプターが標的配列を特異的に認識する際には、P box・D boxに加えて、T/A boxと名付けられた領域も重要であることが知られている(図1.3)(Wilson et al., 1992)。

1.5 TLX

RXRに類似のcDNAとして単離されたオーファンレセプターTLXは、構造的にも機能的にもショウジョウバエの形態形成遺伝子TLLの脊椎動物ホモログと考えられており、脊椎動物初期胚では、前脳・中脳の神経上皮、網膜、嗅覚上皮に局限した発現が見られる(Yu et al., 1994; Monaghan et al., 1995)。カエル胚を用いた実験から、*in vivo*でTLXの機能を阻害すると眼胞の形成が阻害されることが示され、眼の発生過程でTLXを介した転写制御が重要な役割を果たしていることが示された(Holleman et al., 1998)。一方、TLX遺伝子を欠失したマウスでは大脳辺縁系に異常が見られるものの、眼では特に異常が観察されず、正常に発達することが示され、RAR・RXRを欠失したマウスに見られるように、TLXの機能が別の因子によって補償されている可能性も示唆されている(Monaghan et al., 1997)。TLXは他の核内レセプターではほぼ完全に保存されているP box中のリジン残基がセリン残基に置き換わっており、その結果、AGGTCAではなく、AAGTCAという標的配列を特異的に認識し、単量体で結合することが示されている(図1.3)(Yu et al., 1994)。しかし、TLXの直接の機能や標的遺伝子については不明である。

1.6 本研究の流れ

従来間接的にしか研究できなかったホルモン・ビタミンの持つ作用も、近年の分子生物学の発展により、その受容体である核内レセプターの機能解析を通じてより直接的に理解できるようになった。本研究の前半部分では、特にヒトやマウスでプロモーター領域にRA応答配列(β RARE)の存在が明らかにされておりRAR自身の発現がRAによって増幅されることが知られているRAR β 遺伝子(de Thé et al., 1990; Sucov et al., 1990)を中心に解析を進めた。トリではRAR β 遺伝子の発現がRAによって増幅される(Noji et al., 1991)ことは知られていたが、トリについてはそのプロモーター領域の構造が明らかにされていないため、作用機構はこれまで明らかではなかった。そこで今回トリRAR β 2プロモーター領域を単離し、トリRAR β 2プロモーター上にも β RAREが存在するばかりでなく、転写開始点付近の約190塩基対にわたる領域でヒト、マウスと87%の相同性を示すことを明らかにした。このプロモーター領域は細胞種特異的なRA応答能を持ち、その特異性の発揮にはMDRと名付けた約20塩基対からなるcis配列と、これまで機能が不明であったオーファンレセプターTLXの作用が重要であることが判明した。

RARの発見以来、RAによるシグナル伝達はRAR・RXRを中心に語られてきたが、レチノイドの多様な作用に対して、RAR・RXR以外に核内レチノイドレセプターが存在する可能性を検討することは有意義である。またこれまで述べてきたように、オーファンレセプターを同定し、そのリガンドを探索することによって、新たな脂溶性低分子を介したシグナル伝達経路を明らかにするというアプローチも可能である。そこで、本研究の後半部分では、TLXの標的配列特異性が他の核内レセプターとは異なることに注目し、その特異性を決めるTLXのP boxアミノ酸配列を指標にして、眼で発現する新たな核内レセプター遺伝子の探索を試みた。その結果TLXに類似した新規のレセプター型転写因子PNR(Photoreceptor-specific Nuclear Receptor)を同定した。

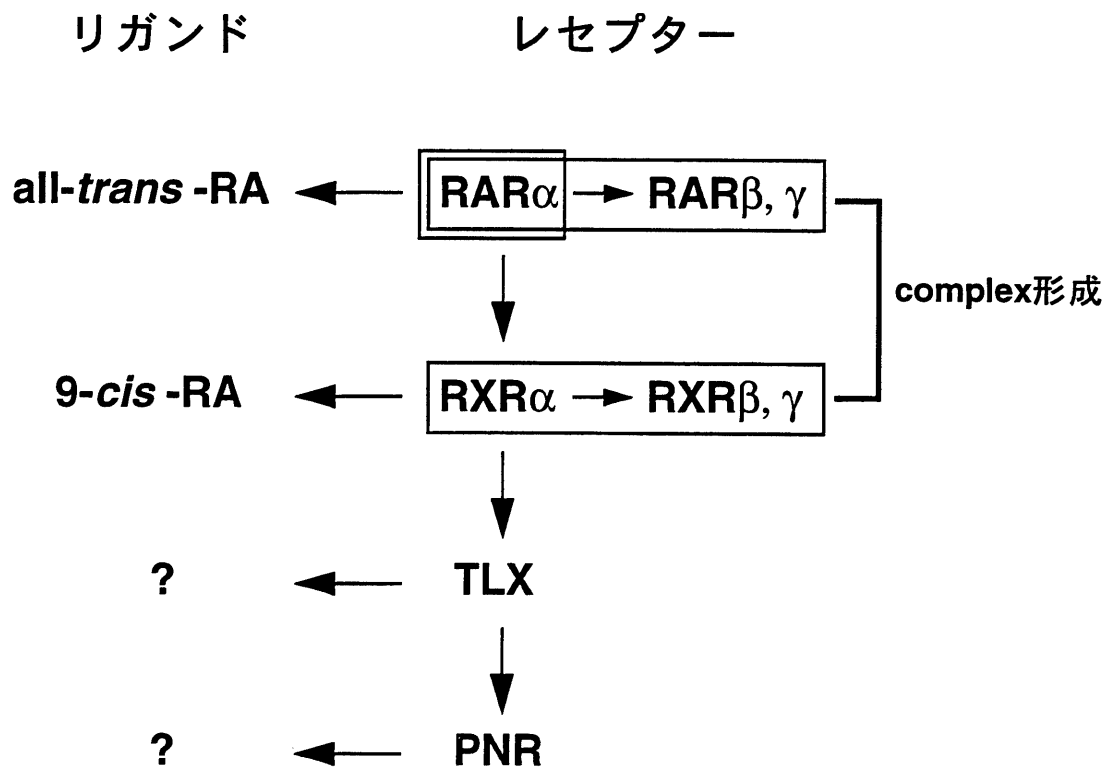


図 1.5 研究の流れ

2. 材料と方法

分子生物学的な一般的手法(プラスミドDNA調製、精製、サブクローニング等)についてはMolecular Cloning 2nd edition (Sambrook et al., 1989) 及びCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1998)を参考にし、FISH法による染色体マッピングは京都府立医大の谷脇雅史博士と、切片*in situ*ハイブリダイゼーション法による解析は京都大学ウイルス研究所の原健二博士との共同研究によって行った。また、本研究で用いたオリゴヌクレオチドの配列は別表1にまとめた。

2.1 動物細胞培養

10%の牛胎児血清(Fetal Bovine Serum; FBS)、100U/mlのペニシリンGカリウム(萬有製薬)、100 μ g/mlの硫酸ストレプトマイシン(明治製菓)を加えたDMEM培地(日本製薬)、RPMI1640培地(ICN)、あるいは α MEM培地(Lifetechnologies)を用いて培養した。用いた細胞株と培地の組み合わせは別表2にまとめた。無血清培地ではFBSの代わりにITB{5 μ g/mlずつのInsulin (SIGMA I-2767)、holo transferrin (SIGMA T-6665)それに0.01%の牛血清アルブミン(SIGMA A-7030)}を加えた。ニワトリの種卵は竹内孵卵場あるいはヤマギシの村由来のものを用いた。発生は37 $^{\circ}$ Cの恒温器中で進行させ、発生ステージはHamburger Hamiltonのものに従った(Hamburger and Hamilton, 1951)。トリ網膜の初代培養は4.5日胚から眼を摘出し、PBS中で神経網膜を取り分けて0.125%トリプシン(DIFCO)とピペッティングによって細胞塊をなくし、24穴プレート(COSTAR-3524)上、DMEM培地中で培養した。

2.2 FBS中脂溶性物質の除去

FBS(Lifetechnologies / 三光純薬)に等量のn-heptaneを加え、室温で2時間攪拌した後30分間静置し、2層に分離させた。下層を回収して等量のn-heptaneを加え、室温で2時間(あるいは一晩)攪拌した後、30分間静置し、2層に分離させた。下層を回収してその1リットルあたり50gのイオン交換樹脂(Biorad AG 1-X8, Analytical grade; 200-400mesh)と20gの活性炭(ナカライテスク, 粒状)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌し、さらに室温で6時間(あるいは一晩)攪拌した。次に遠心(4000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30min; Beckman JA-10)して上清を回収し、樹脂及び活性炭による脂質分吸着の操作をくり返した後再び遠心して上清を回収し、最終的に0.2 μ mのメンブレンフィルターを用いて濾過滅菌を行った。

2.3 レポーター遺伝子を用いた転写活性の測定

基本的には梅園らの方法(Umesono et al., 1991)に従い、24穴プレート上で培養した細胞にリン酸カルシウム法を用いて遺伝子を導入した。レポータープラスミドは1穴あたり50ng(CMVプロモーターを持つもの)、150ng(TKプロモ-

ターを持つもの)あるいは250ng(RAR β 2 プロモーターを持つもの)と350ngの補正用の β -ガラクトシダーゼ発現プラスミド(pCMX- β GAL; Umesono et al., 1991)を使用し、pGEM4を用いて全体のプラスミド量を750ngに合わせた。6~9時間後にPBSで二度洗ってリン酸カルシウムの沈殿を除いた後、リガンドまたは、溶媒のみを加えた培地中で、24時間~36時間培養を続け、PBSで二度洗った後、1穴あたり100 μ lの細胞溶解液を加えて細胞抽出液とした。ONPGを基質として細胞抽出液50 μ lを用いて β -ガラクトシダーゼ反応を行い、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices)で420nmにおける吸光度を測定して活性を評価した。またルシフェリンを基質として細胞抽出液20 μ lを用い、Luminoskan (Labsystems)でルシフェラーゼ活性を測定した。最終的にルシフェラーゼ活性を β -ガラクトシダーゼ活性で除することにより、トランスフェクション効率によるばらつきを補正した。なお、全てのデータポイントは3点ずつ測定してその平均値を求めた。

2.4 動物個体、培養細胞からのRNA抽出

PBS中で組織を分離し、ガラスホモジナイザー中でISOGEN(ニッポンジーン)とともに破碎した。付着性培養細胞からの場合は培地を廃棄し、PBSで一度洗浄した後、ゴムへらで掻き取った。浮遊性培養細胞からの場合は1.5mlチューブに移し、3000rpmで遠心して上清を除き、PBSで懸濁して洗浄した。抽出の条件等は、ISOGEN付属の説明書に従った。poly-A+ RNAはOligo(dT)-Latex ビーズ(日本ロシユ)を用いて調製した。

2.5 RT-PCR

RNA PCR kit (TaKaRa)を用い、total RNA 1.0 μ g を鋳型として、random 9mersを用いてRT反応を行った。その1/4量(トリRAR β については全量)を鋳型として200 μ lチューブ中で、2.5UのEx-Taq (TaKaRa)を用いて、94 $^{\circ}$ C 30sec, 60 $^{\circ}$ C (トリRAR β については70 $^{\circ}$ C) 60sec, 72 $^{\circ}$ C 90secのPCR反応を30サイクル行った。プライマーは、トリRAR β 1(NMO46, NMO21)、トリRAR β 2プロモーターに由来する転写産物(NMO3, NMO21)、ヒトTLX(NMO68, KMO14)、ヒトPNR(KMO4, NMO71)、ヒトCRX(KT1, KT2)、ヒトNRL(KMO7, KMO8)、ヒトRAR α (NMO40, NMO41)、をそれぞれ20pmolずつ用いた。他の条件は、付属の説明書に従った。

2.6 cDNAの単離

2.6.1 ヒトTLX

ヒト胎児脳cDNA library (Lifetechnologies : pCMV \cdot SPORT2に組み込まれたプラスミドlibrary)をSemi-solid法で増幅し、GENETRAPPER cDNA Positive

Selection System (Lifetechnologies)(Li et al., 1995)とHPLC精製したNMO63プローブを用いて 4×10^{11} のクローンをスクリーニングした。capture反応、repair反応のどちらにもNMO63を用いた。その他の条件等は付属の説明書に従い、DH5 α (TOYOBO)を用いて、あるいはDH10B(Lifetechnologies)とT820エレクトロポレーター(BTX)を用いて形質転換を行った。

2.6.2 ヒトPNR

1.8pmolのT3-oligo(dT) adapter primerとY79 retinoblastoma細胞から調製した1.2 μ gのpoly-A+ RNAそれに200UのSuperscriptII Reverse transcriptase (Lifetechnologies)を用いて40 μ lの反応系でcDNAを合成した。合成反応は37°C, 45°C, 50°C, 55°Cでそれぞれ30minずつ行い、最後に70°Cで15min放置して反応を終了させた。2.4UのRNase Hを37°Cで30min反応させてRNAを分解し、フェノール・クロロホルムで抽出した。2 μ lを鋳型に用い、2.4と同様の条件でプライマー(KMO4, T3)を用いてPCRを行った。さらにこの反応産物の1/50を鋳型として用い、プライマー(NMO70, T3)を用いて23サイクルのPCRを行った。増幅された約1.9kbの長さの断片をpMOS blue T-vector (Amersham)に組み込み、塩基配列を決定した。この情報に基づき、コード領域に対しては、(KMO19, NMO71)、(KMO41, KMO39)の組で2.5と同様のPCRを行い、コード領域の全塩基配列を決定した。さらにNMO71をアダプターとしてcDNAを合成し、5' RACE system (Lifetechnologies)(Frohman et al., 1988)とKMO1、KMO20を用いることによりcDNAの5' 端を決定した。

2.6.3 トリPNR

一回目のスクリーニングではトリ 8日目胚神経網膜細胞から調製した3 μ gのpoly-A+ RNAとLambda System for cDNA Cloning (Lifetechnologies), Gigapack III Gold Packaging Extract (STRATAGENE)を用いて $0.4-0.8 \times 10^5$ pfuのlibraryを作製した。ただし、cDNA合成の条件は37°C, 60minとした。プローブは、ヒトPNR 3'RACEクローンのNMO70とT3によるPCR増幅断片を鋳型とし、 α^{32} P-dCTPをMegaprime DNA labelling system (Amersham)で取り込ませることによって作製した。フィルターはHybond-N+ (Amersham)を用い、7%SDS, 5%Dextran Sulfate, 0.5M Na-PO₄ (pH7.35)緩衝液中60°Cの条件で一晩ハイブリダイズした後、最終的に0.5xSSPE, 0.1%SDS, 60°Cの条件で洗浄した。その結果トリPNRに関してはcloneA1, A2, A3の3クローンが得られた。二回目のスクリーニングは一回目と同様にして 2.0×10^5 pfuのlibraryを作製し、プローブはトリPNRcloneA1の最も5'端の部分をプライマーKMO40とKMO22でPCR増幅した領域に α^{32} P-dCTPを取り込ませて作製した。ただし、cDNA合成の条件は37°Cで60min, 45°C, 50°C, 55°Cでそれぞれ30minとし、最終的な洗浄は

0.2xSSPE, 0.1%SDS, 60°Cの条件で行った。その結果cloneB3-1, B1-1, B2-2の3クローンが得られた。

2.6.4 マウスPNR

マウス成体の眼から調製したtotal RNA 1.0 μ g を用いて2.5と同様のPCRを行った。ただし合成したcDNAの1/2量をPCRの鋳型とし、annealの温度は55°C、プライマーはKMO47とKMO49を用いた。増幅された約0.8kbの長さの断片をpGEMT-easy T/A-vector (Promega)に組み込み、塩基配列を決定した。

2.7 遺伝子の単離

2.7.1 トリRAR β 2プロモーター領域

まず、50ngのトリゲノムDNAを鋳型とし、NMO9, NMO2それぞれ200ngをプライマーとして、94°C 30sec, 50°C 60sec, 72°C 60secの反応を35サイクル行った。DNA合成酵素は2.5UのTaq (Lifetechnologies) を用い、他の条件は、DNA合成酵素付属の説明書に従った。次に、反応液(100 μ l)のうち2 μ lを鋳型としてNMO1, NMO8それぞれ200ngをプライマーとして、同様の反応を25サイクル行った。増幅された約220kbの長さの断片をpMOSblue T-vectorに組み込み、塩基配列を決定した。

2.7.2 ヒトPNR

プライマーKMO19とKMO20を用い、Genome systems社よりヒトP1クローンを取得した。添付の説明書に従ってDNAを調製しXbaIで切断することによって生じた8.5 kbの断片をpBluescriptSK+に組み込み、エクソン1から7の全塩基配列とエクソン/イントロン境界を決定した。エクソン8についてはP1クローンを鋳型に、プライマーKT9とKMO39を用いてPCRを行い、その塩基配列を決定した。

2.8 サザン・ノザンハイブリダイゼーション

ヒトPNR LBDをKMO25とKMO39でPCR増幅した領域に α^{32} P-dCTPを取り込ませることによってプローブを作製し、Zoo-blot(Clontech)に対してハイブリダイゼーションを行った。洗いの条件を60°C, 0.2xSSPE, 0.1%SDS, 30minを二回とした以外、検出の条件等は付属の説明書に従った。ノザンプロットでは上記と同様に α^{32} P-dCTPを取り込ませるか、あるいはDIG-11-dUTP (Boehringer Mannheim)をPCR法で取り込ませることによってプローブを作製した。用いたプライマーの組み合わせは、ヒトTLX(NMO68, KMO14)、トリTLX(cTlx5', cTlx3')、ヒトPNR(KMO4, NMO71; KMO25, KMO39)、トリPNR(KMO6, KMO22; KMO23, KMO24)、 β アクチン(NMO53, NMO54)である。泳

動は標準的なホルムアルデヒド変性ゲルMOPS緩衝液中で行い、20xSSCでキャピラリー法によりBIODYNE PLUSメンブレン(日本ジェネティクス) にブロットした後、UVクロスリンクで固定した。totalRNAを用いた場合は0.02%メチレンブルー/10%酢酸溶液でRNAを染色し、リボゾームRNAをloading controlとした。ラット網膜poly-A+ RNAおよびMultiple Tissue Northern Blot (human, rat) はClontech社のものを用い、検出の条件等は、付属の説明書に従った。Washの条件は65°C, 0.1xSSC, 0.1%SDS, 30minを二回としたが、ヒトPNRプローブを用いてラットRNAに対してハイブリダイゼーションを行った場合のみ、60°C, 0.2xSSPE, 0.1%SDS, 30minを二回とした。

2.9 ゲル移動度シフト法

10cmシャーレ上で培養したCOS-1細胞に2.3と同様にして一過的にプラスミドを導入することによって目的のタンパク質を強制発現させた。ただし、リン酸カルシウムの沈殿を除いてからタンパク質を回収するまでの時間は24時間とした。2.4と同様にして細胞を回収し、20mM Tris (pH7.5), 400mM KCl, 2mM DTT, 1mM PMSF, and 20% glycerolの溶液中に懸濁し、これをCOS細胞からのタンパク質抽出液とした。タンパク質濃度はprotein assay kit (BIO-RAD) (Bradford, 1976)を用いて測定し、24 μ gをゲルシフトに用いた。あるいはウサギ網状赤血球を用いた*in vitro*タンパク質合成系 (Promega) で調製し、8 μ lをゲルシフトに用いた。DNA・タンパク質結合反応及び泳動は基本的に梅園らの方法 (Umesono et al., 1991)を用い、泳動緩衝液は0.5x TBE、長さ16cmの5%アクリルアミドゲルに対して135[V]の一定電圧という条件で泳動した。用いたプローブの配列は：m β RARE, agctTAAGGGTTCACCGAAAGTTCAGCTGCATagct; kruppel, agctTCGGCAATTA AGAAGTCAAATTTCTagct; Kni x2, agctTAACCCTTTTAAAAGTCAAAAGTCAACTTCCAACagct (小文字は5'一本鎖突出末端)で、Klenowポリメラーゼを用いて両端に α^{32} P-dCTPを取り込ませることによって作製した。競合実験に用いた非標識プローブの配列はMDR, agctTGGTTCATTTGAAGGTTAGCagct; NS, agctACAAGGTTACGAGGTTACAGTCagctで、それ以外の配列は図中に示した通りである。抗体を用いたスーパーシフト実験では20 μ lのDNA・タンパク質結合反応系に対して2 μ lのウサギ抗-HA抗体 (#sc-805)あるいはpolII抗体 (#sc-899) (Santa Cruz Biotechnologies)を用い、氷上で70分間反応させた。

2.10 プラスミドの構築

TKプロモーターを持つルシフェラーゼのレポータープラスミドはTK-LUC (Glass et al., 1990)あるいはTK- β RE-LUC (Damm et al., 1993)のHindIIIサイトに合成したオリゴヌクレオチドを挿入することによって作成し、塩基配列を

決定して目的のプラスミドが作られていることを確認した。挿入したオリゴヌクレオチドはm β RARE、MDRについては2.9に示した通りで、c β RAREの配列はagctTGGGTTTCACAGAAAGTTCACTCGagctである。

pMOS-2cRAR β 2promoter(2-2)は、NMO7とNMO8によってトリゲノムDNAから増幅したバンドをpMOS*blue* T-vector (Amersham)に組み込むことによって作製した。cRAR β 2- Δ 119-LUCはpMOS-2cRAR β 2promoter(2-2)からHindIII/BamHIで切り出した断片をTK-LUCのHindIII, BglIIIサイトで、cRAR β 2- Δ 85-LUCはpMOS-2cRAR β 2promoter(2-2)を鋳型として(NMO2, KMO45)のプライマーセットでPCR反応を行い、増幅されたバンドを精製した後、SalI, BamHIで切り出したものをTK-LUCのSalI, BglIIIサイトで、mRAR β 2-LUCはマウスRAR β 2プロモーターの転写開始点を含む上流約2.2kbの領域をTK-LUCのSalI, XhoIサイトで、またmRAR β 2- Δ 66-LUCは、mRAR β 2-LUCを鋳型として(NMO5, NMO6)のプライマーセットでPCR反応を行い増幅されたバンドを精製してTK-LUCのBamHI, XhoIサイトで、それぞれTKプロモーターと入れ替えることによって作成した。krüppel配列を2コピー持ったCMV-LUCはCMX-LUC (Umesono et al., 1991)、のSnaB1サイトに合成オリゴヌクレオチド(TCGGCAATTAAGAAGTCAAATTTCTAC)を2コピー挿入することによって作成した。トリPNR発現プラスミドはpCMXベクター(Umesono et al., 1991)にトリPNRコード領域を挿入することによって作製し、RAR α 、RXR α 、cTLXについてはそれぞれpCMX-RAR α (Umesono et al., 1991)、pCMX-RXR α (Yao et al., 1993)、pCMX-cTLX(Yu et al., 1994)を用いた。HA-タグ付きのヒトPNR発現プラスミドはHA-タグ配列(MVYPYDVPDYA)を持つpCMXベクター(Umesono et al., 1991)にヒトPNRコード領域をin frameで挿入することによって作製した。マウスCRXのcDNAプラスミドはハーバード大学医学部の古川貴久博士並びにC. Cepko博士に提供していただいた。

別表1 本研究で用いたオリゴヌクレオチド

cT1x5'	5'-ATCCAGGCTTTACAGGAGGTTGTGG-3'
cT1x3'	5'-TCCGAAACGACAGGGTTGTGTAGG-3'
KMO1:	5'-AGATGCCATAGTGCTTCCCGCTGC-3'
KMO4:	5'-CCATGGAGACCAGACCAACAGCTC-3'
KMO6:	5'-CCAGTGGACAAGGCACACCGCAAC-3'
KMO7:	5'-CTGCTCCATGGAGCCTTCAGTCTC-3'
KMO8:	5'-AACCGCTCTGCCAGCTGGACGTGCT-3'
KMO14:	5'-GGCAGGTCATAGCTACTGGAATGC-3'
KMO19:	5'-AGACAGAGGTTTCATGGACTGAGGC-3'
KMO20:	5'-CCCATCTGCCTGGAGACTCCTTC-3'
KMO22:	5'-CGTGCTGAGGTCTCGTAGACGTT-3'
KMO23:	5'-TCTGTGCCATCCAGTGGTCCATGC-3'
KMO24:	5'-GTTCTTGAACATGTCGCAGAGCAGC-3'
KMO25:	5'-GGATCAGGTGATCCTGCTGGAAG-3'
KMO26:	5'-GTCTTGCCTGTTCTTGAACCTCTGC-3'
KMO39:	5'-GCTTGAAACATTTACCTCCACCC-3'
KMO40:	5'-TAGACAGCATTGAGCTGGACGCCGA-3'
KMO41:	5'-TGTAACCCATGGAGACCAGACCAAC-3'
KMO45:	5'-GTACGTCGACTGGGTCATTTGAAGGTTAGCAG-3'
KMO47:	5'-CATCTATGCCTGCAACGGCTGCAG-3'
KMO49:	5'-TTCATGCAGGCAAACCTCCGTGGG-3'
KT1:	5'-GGCTCTGAAGATCAATCTGCCTGA-3'
KT2:	5'-CCATAGCTCTGGCCTGATAGGGAG-3'
KT9:	5'-GATGCTGAGCCAGCACAGCAA-3'
NMO1:	5'-GCTCTTGCAGGGCTGCTGGGAGTTT-3'
NMO2:	5'-AATCTCTCTAGAACCCAGTCCCGTTCCTCAG-3'
NMO3:	5'-CTGAGGAACGGGACTGGTTCCTAGAGAGATT-3'
NMO5:	5'-GGTGGATCCAGCAGCCCGGAAGGTTACCCGAA-3'
NMO6:	5'-GTACTCGAGGCACGGGAACTCTGGTCCCCCCTT-3'
NMO7:	5'-AAGCTCTGTGAGAATCCTGGGAG-3'
NMO8:	5'-CCCTCAGCCATGAATAGATCCTTC-3'
NMO9:	5'-CCTGCCTCTCTGGCTGTCTGCTTT-3'
NMO21:	5'-CTTGGAACAAGTTCCTCAGAACTGGTGCTC-3'
NMO40:	5'-GCAGCAGTTCTGAAGAGATAGTGCC-3'
NMO41:	5'-GAGTTCACTGAACTTGTCCCAGAGG-3'
NMO46:	5'-ACTGAATGGTGGTCTGAGACACGGACTAAG-3'
NMO53:	5'-GATGGTCAGGTCATCACCATTTGG-3'
NMO54:	5'-CATCGTACTCCTGCTTGCTGATCC-3'
NMO63:	5'-GACAACTCCGGTTAGATGC-3'
NMO68:	5'-GACAACACAGATTCCCAGAAGCTG-3'
NMO70:	5'-TCTGATGAGCTCCACAGTGGCTGC-3'
NMO71:	5'-CGTACGCTCCTCTTGAAGAAACCGC-3'
T3:	5'-GCAATTAACCCTCACTAAAGGG-3'

別表2 本研究で用いた細胞株（アルファベット順）

細胞名	動物種	由来	培地	ATCC No.
293	human	Embryonal kidney, transformed	1	CRL-1573
A-172	human	Glioblastoma	1	CRL-1620
A-431	human	Epidermoid carcinoma	1	CRL-1555
Caco-2	human	Adenocarcinoma, colon	1	HTB-37
COS-1	monkey	Fibroblast, kidney, transformed	1	CRL-1650
CV-1	monkey	Fibroblast, kidney	1	CCL-70
HEL 92.1.7	human	Erythroleukemia	2	TIB-180
HeLa	human	Epitheloid carcinoma, cervix	1	CCL-2
Hep G2	human	Hepatocellular carcinoma	1	HB-8065
HL-60	human	Promyelocytic leukemia	2	CCL-240
HT-29	human	Adenocarcinoma, colon	1	HTB-38
HuTu 80	human	Adenocarcinoma, duodenum	1	HTB-40
IMR-32	human	Neuroblastoma	1	CCL-127
JEG-3	human	Choriocarcinoma	1	HTB-36
MC3T3-E1	mouse	Osteoblast	3	-
MCF7	human	Adenocarcinoma, breast	1	HTB-22
NT2/D1	human	Pluripotent embryonal carcinoma	1	CRL-1973
SK-N-MC	human	Neuroepithelioma	1	HTB-10
T-47D	human	Ductal carcinoma, breast	2	HTB-133
THP-1	human	Monocyte	2	TIB-202
U-937	human	Histiocytic lymphoma	2	CRL-1593
Y79	human	Retinoblastoma	2	HTB-18

培地：1, DMEM; 2, RPMI1640; 3, α -MEM

3. 結果

3.1 TLXによるRAR β 2プロモーターのRA応答性制御

3.1.1 新規RAR β 転写産物の同定

細胞によるRA応答性の違いは内在的なRAレセプター(RAR)の発現量によっても大きく左右されると考えられる。マウスではRAR β 2プロモーター領域には β RAREと呼ばれるRA応答配列が同定され、RAによって正のフィードバックをうけるほか、さらに選択的スプライシングによって2種類のアイソフォームが作り出されることが知られている(Nagpal et al., 1992)。またcDNAライブラリーのスクリーニングからトリ胚でもマウスRAR β と同様に β 1、 β 2の異なったプロモーターに由来すると考えられるアイソフォームが同定されており(Noji et al., 1991; Smith et al., 1995)、トリ胚芽ではat-RAによってRAR β の発現が誘導されることが知られている。しかし、アイソフォームの解析や他の細胞でも同様に誘導が起こるのかどうかは明らかにされていない。そこで従来よりRAに高い感受性を示すことが知られている神経網膜細胞に注目してその発現及び相対量を検討することとした。まずRAR β 1プロモーターに由来するmRNAについては β 1特異的なプライマーを、 β 2プロモーターに由来するmRNAに関しては、マウスで知られているスプライシングサイトの両側を挟むようにプライマーを設計した。次に4.5日目胚から調製した神経網膜細胞の初代培養系に1 μ Mのat-RAを添加して、12時間後、36時間後にRNAを抽出してRT-PCRを行い、RAR β のmRNAを検出した(図3.1)。その結果RAR β 1に由来するmRNAに関してはat-RAの添加に関わらず発現が見られたのに対して、 β 2プロモーターに由来するmRNAはいずれのアイソフォームも通常発現量は低く、RAの添加によって12時間以内に誘導されてくることがわかった(図3.1)。RAR β 2プロモーターに由来するmRNAの発現パターンは、RT-PCR産物を電気泳動で確認した限り、神経網膜細胞で3日目、4日目、17日目も変わらず、トリ胚17日目のレンズ、肺、心臓細胞でも同様であった(データは示していない)。

これまでトリではRAR β 1プロモーターに由来するアイソフォームとして β 1、 β 3が、 β 2プロモーターに由来するアイソフォームとして β 2、 β 4(今回のPCRではそれぞれ514bpと288bpのクローンに相当する)が同定されている。電気泳動パターンからは β 2プロモーターに由来する3種類のアイソフォームが確認できたが、さらにそれぞれのバンドを切り出して塩基配列を決定したところ、これまで知られていた2種類の他、285bp、158bp、155bpの合計5種類のmRNAが生じていることを新たに見いだした(図3.1, 3.2)。これらのmRNAは選択的スプライシングによって生じていると思われる。マウスでは今回の158bpのクローンに相当するものが β 4と名づけられており混乱を招く恐れがある。そこで図3.1に示したように β 2プロモーターに由来する5種類のアイソフォームは長い方から順に β 2{(d2, a3): スプライシングドナーサイト2とアクセプターサイト3においてスプライシングされた転写産物; 以下同様}、 β 4'(d1, a1; d2, a3)、 β 4(d1, a2; d2, a3)、 β 4M(d1, a3)、 β 4M'(d1, a4)と呼ぶ。マウスRAR β 4では開始コドンにCTG(ロイシン)コドンを用いて翻訳が始まることが報告されている(Nagpal et al., 1992)が、トリにおいても同じ位置にCTGコドンが存在しており(図3.2)、本来の開始メチオニンコドンを含まないアイソフォームでは、このCTGコドンから翻訳が始まると予想される。また脊

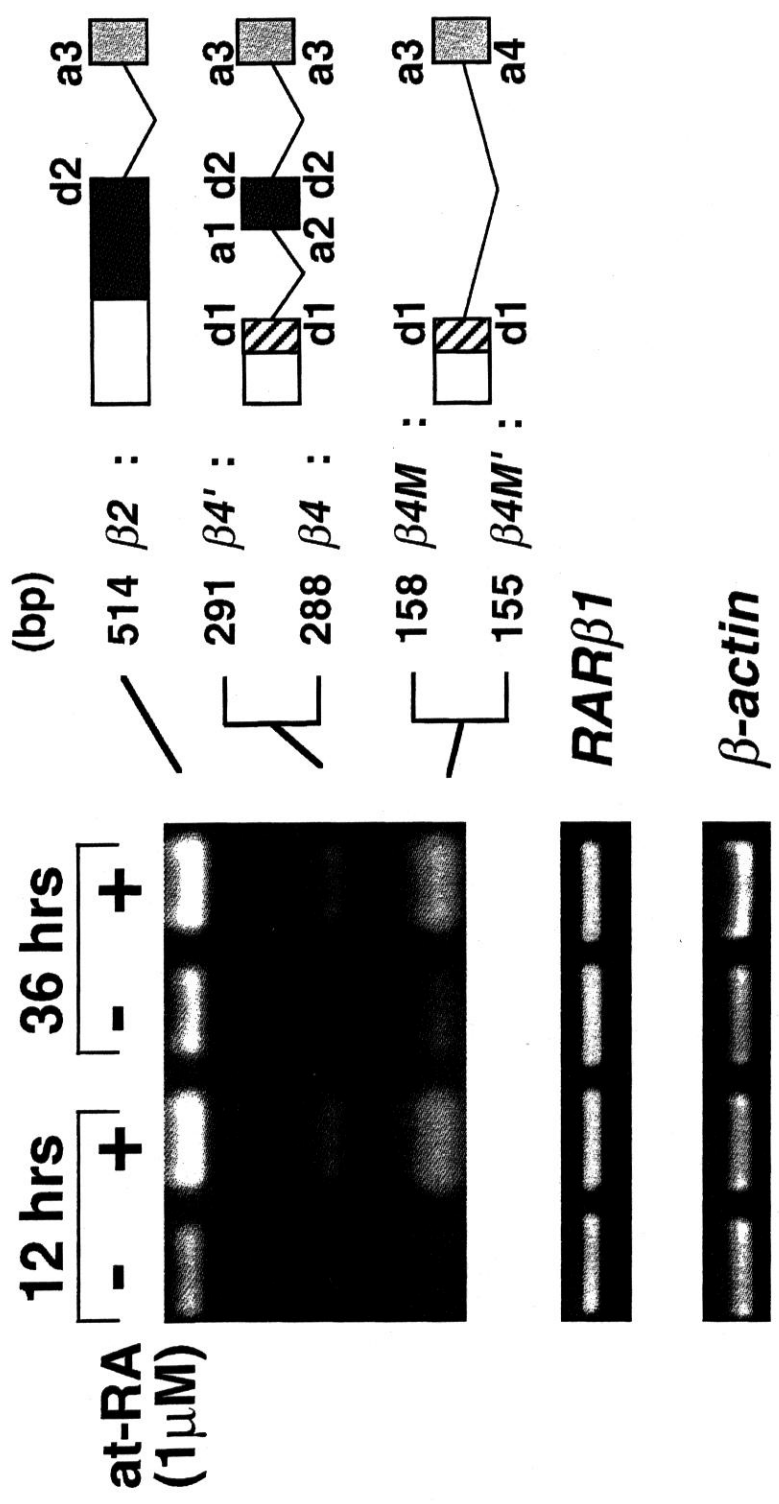


図 3.1 トリ初代培養細胞における RAR β 転写産物の at-RA による誘導

トリ初代培養細胞では通常 RAR $\beta 2$ プロモーターに由来する転写産物の発現量は低い、培養液中に at-RA を加えることによって 12 時間以内に強い誘導が見られ、少なくとも 36 時間は発現量が持続する。RAR $\beta 1$ プロモーターに由来する転写産物の発現量は at-RA による影響は受けない。各断片の大きさ、名称を右に示した。5 つの転写産物の DNA 配列から予想される RAR β タンパク質のアミノ酸の位置を右側に模式的に表した。いずれも、DNA 結合ドメインより N 末端側にアミノ酸の欠失が見られる。図中 d1, d2 はドナーサイト、a1, a2, a3, a4 はアクセプターサイトを示す。

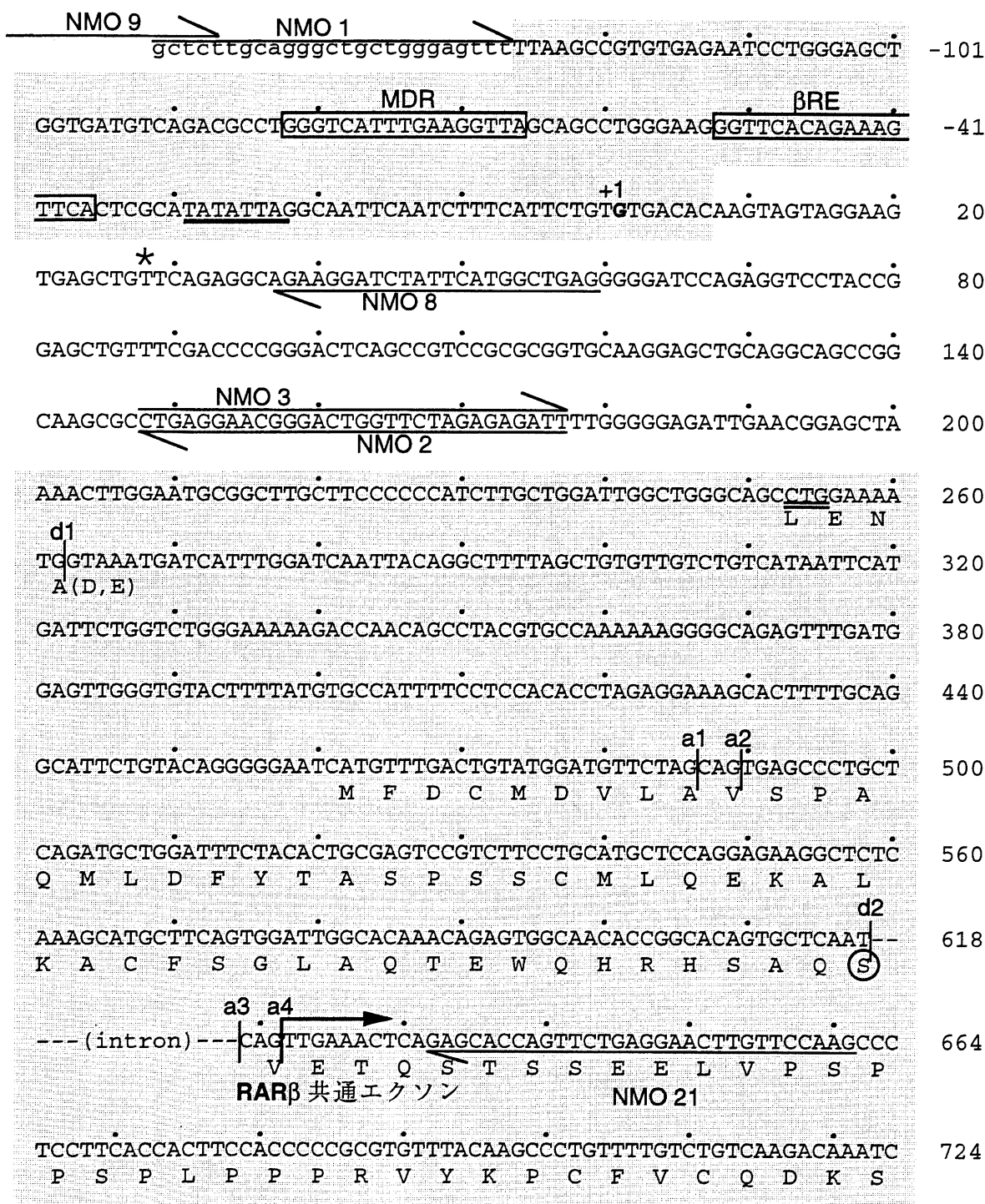


図 3.2 トリRARβ2プロモーター領域の塩基配列

予想される転写開始点を+1とし、グアニン塩基を太字で示した。クローニング
 あるいはRT-PCRに用いたプライマーを矢印で、MDR、βREを四角で、TATA
 boxを下線で、cDNAスクリーニングで得られた最も5'上流側の塩基を米印で、
 マウス・トリ間で相同性の高い領域は影を付けて、それぞれ示した。d1, d2それ
 にa1, a2, a3, a4はそれぞれスプライシングのドナーサイト、アクセプターサイト
 を示す。RARβ1プロモーター由来のものも含むRARアイソフォームに共通の
 エクソンを太い矢印で、マウス遺伝子でイントロンが存在するセリン残基を丸
 で囲んで、マウスβ4の翻訳開始ロイシンコドンに二重下線で示した。

椎動物で知られているイントロンのほとんどは5'側末端にGT、3'側末端にAGの配列が存在することが知られており(Breathnach and Chambon, 1981)、マウスではRAR β 2タンパク質の53番目のセリンコドンの部分(図3.2)にイントロンの存在が知られている。このことと今回158bpのクローン(RAR β 4M)が同定されたことから、トリでも同じ箇所にイントロンの存在が予想される。以上のことからトリ肢芽で観察されたようにRAR β 遺伝子のat-RAによる誘導は神経網膜細胞でも観察されること、マウス・トリ間でスプライシングの機構がきわめてよく保存されていることが明らかとなった。そこでトリRAR β 2プロモーター領域を解析することにより、RAR自身の発現制御機構とRAR標的遺伝子の発現制御機構に関して新たな知見が得られると考えた。

3.1.2 トリRAR β 2プロモーター領域の単離

RAR β 2プロモーター領域は転写開始点付近の246塩基対にわたってマウス・ヒト間で94%と非常に高い相同性を示すことが知られており、この領域には先に述べたように β RAREなどの転写制御配列が同定されている(Dey et al., 1994)。そこでトリRAR β 2プロモーター領域を同定する目的でヒト・マウス間で特によく保存されている領域に上流側のプライマーを、下流側はトリ特異的なプライマーを設計し、トリゲノムDNAを鋳型としてまずプライマーNMO9とNMO2(図3.2)を用いて35サイクルのPCRを行い、その産物を鋳型にしてさらにNMO1とNMO8で25サイクルのPCRを行ってトリRAR β 2プロモーター領域の単離に成功した(図3.2)。この領域のマウス・トリ間での相同性を検討したところ、今回単離できた最も5'端の塩基から下流約140塩基対にわたる領域と、以下に述べる転写開始点の約200塩基対下流からアミノ酸コード領域にかけての領域のみがマウス・トリ間で相同性が非常に高いことがわかった(図3.2)。また、 β RARE配列の他、TATAボックス様の配列もヒト・マウスで同定されているものと同じ位置にあり、以下に述べるようにこの領域が実際にプロモーター活性を持つことから、ヒト・マウスで同定されている転写開始点(de The et al., 1990)のグアニン塩基を、トリRAR β 2プロモーターにおいても転写開始点であると考えた。

3.1.3 トリRAR β 2プロモーター領域の機能解析

今回単離したトリRAR β 2プロモーターが実際にプロモーターとしての機能を持つかどうかを確かめるため、ルシフェラーゼのレポーター遺伝子に組み込み、トリ神経網膜初代培養細胞に導入することによって転写活性を測定した。その結果、この領域が実際に転写活性を持つこと、マウス・ヒトで知られていたように、at-RAに応答して転写が活性化されることが判明した(図3.3A)。RAR特異的アゴニスト(TTNPB)ではat-RA、9-cis RAと同様の活性化が見られたが、RXR特異的アゴニスト(LG69)では活性化されないことから、この転写活性化が主にRARを介して行われていることが示唆された(図3.3A)。

次にマウス骨芽細胞株MC3T3-E1やサル線維芽細胞株CV-1にこのレポーターを導入して同様の実験を行い、トリ神経網膜細胞の結果と比較したところ、at-RAによる転写誘導は線維芽細胞株に比較してきわめて感受性が高いことがわかった(図3.3B)。

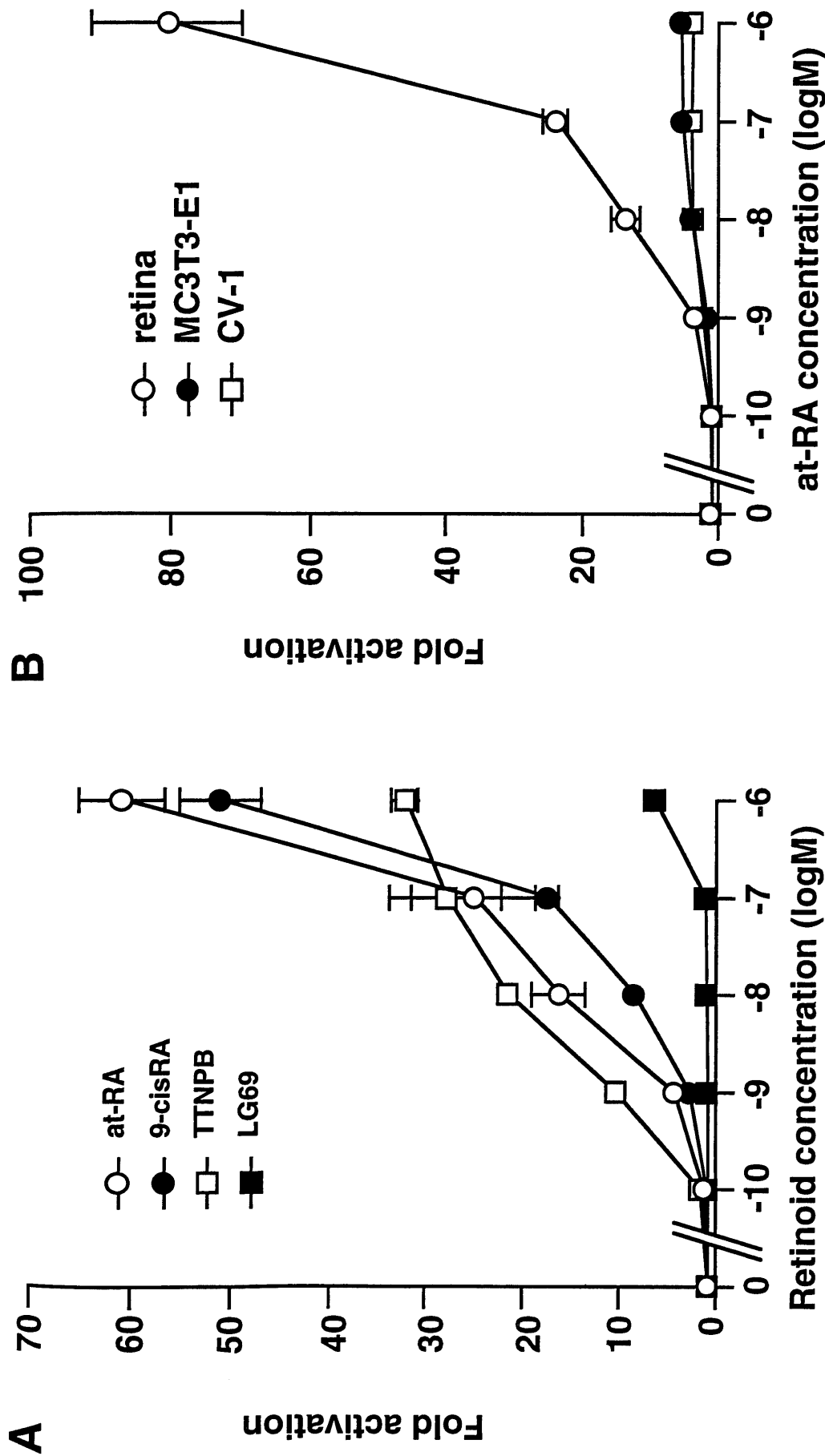


図3.3 レチノイドによるトリRAR β 2プロモーターの転写活性化

A) トリRAR β 2プロモーターのレポータープラスミドを作成し、初代培養のトリ神経網膜細胞中に導入して各種レチノイドによる転写活性化を比べた。RARのアゴニスト(at-RA, 9-cisRA, TTNPB)にはよく応答するが、RXR特異的アゴニスト(LG69)には応答しない。
 B) A)と同じレポーターを初代培養のトリ神経網膜細胞、マウス骨髄細胞株MC3T3-E1、サル線維芽細胞株CV-1中に導入してat-RAによる転写活性化を比べた。トリRAR β 2プロモーターはトリ神経網膜細胞特異的にRAに非常によく応答する。

3.1.4 核内レセプターTLXによるat-RAに依存した転写調節

図3.3BでCV-1細胞ではRAR β 2プロモーターのat-RAによる転写活性化が低いレベルでしか見られないのは、内在性レチノイン酸レセプターの発現量が低いからであると予想し、RAR α あるいはRXR α を同時に強制発現させたが、それほど応答は上がらなかった(図3.4)。他のサブタイプ(RAR β 、 γ 、RXR β 、 γ)あるいは、RAR α とRXR α を同時に強制発現させた場合も同様の結果となった。そこでリガンド未同定のオーファンレセプターの中にレチノイン酸応答性転写調節因子(即ちレチノイド応答性レセプター)が存在する可能性を考え、RAR, RXRに加えて2種類の核内レセプターを強制発現させてat-RA応答能の変化を検討した(データは示していない)。すると驚いたことにもともとRXRに類似するcDNAとしてクローニングされていたTLXタンパク質をCV-1細胞中で強制発現させた時に、特異的にRAR β 2プロモーターのat-RA応答能が飛躍的に向上することが発見された(図3.4)。脊椎動物TLXタンパク質は前脳・神経網膜に特異的な発現を示し、これまでの研究から眼の器官形成に重要な働きをしていることが示唆されている。今回用いた神経網膜細胞の初代培養系でもTLXの発現は見られるが、MC3T3-E1細胞、CV-1細胞では発現が見られない(データは示していない)。このことから、神経網膜細胞でRAR β 2プロモーターが非常によくat-RAに応答するのは内在的にTLXが発現していることが一つの要因となっていると考えられる。またこの効果はマウス・トリのTLXあるいはショウジョウバエにおける相同タンパク質と考えられているTLLを用いた場合でも観察された(データは示していない)。

3.1.5 細胞種特異的転写調節領域(MDR)の同定

そこで次にRAR β 2プロモーター上での、TLXに反応する領域の同定を試みた。まず、約2 kbのマウスRAR β 2プロモーターを用いた場合でも、TLXの効果が見られることを確認し、上述のTLXによるRA転写応答能上昇の機構は今回単離したトリプロモーターに特異的ではないことを示した(図3.5)。さらに、RAR β 2プロモーターの5'側を順次欠失させたプラスミドを作製し、TLXに反応する領域を解析した(図3.5)。その結果RAR β 2プロモーター上の-85から-66の領域がTLXに反応するために必須であることが判明した(図3.5)。

この領域には、核内レセプターの標的配列に極めて類似した配列が存在し、この配列をMDR (Mime's Direct Repeat)と名付けた。次にMDRがこの領域だけでTLX応答性配列として機能するかどうかを検討するため、MDR配列をチミジンキナーゼ(TK)プロモーターの上流に組み込んだレポータープラスミドを作成してトリ神経網膜細胞中に導入し、at-RAによる転写活性化がみられるかどうか検討した(図3.6 A, B)。ところが予想に反して、この配列は単独ではRA応答性配列として働かないことがわかった(図3.6 B)。また今回同定したトリ β RAREはマウス β RAREとスペーサーの塩基が1塩基異なっているが、トリ β RAREが実際にRAREとして機能することを確認した(図3.6 A, B)。TLXはMDR中に見られる配列(GGGTCA, AGGTTA)に極めて類似したAAGTCAというモチーフに特異的に結合することが知られている(Yu et al., 1994)が、ゲル移動度シフト法を用いてMDRへのTLXあるいはRAR/RXR複合体の結合能を検討した結果、いずれもMDRに直接結合

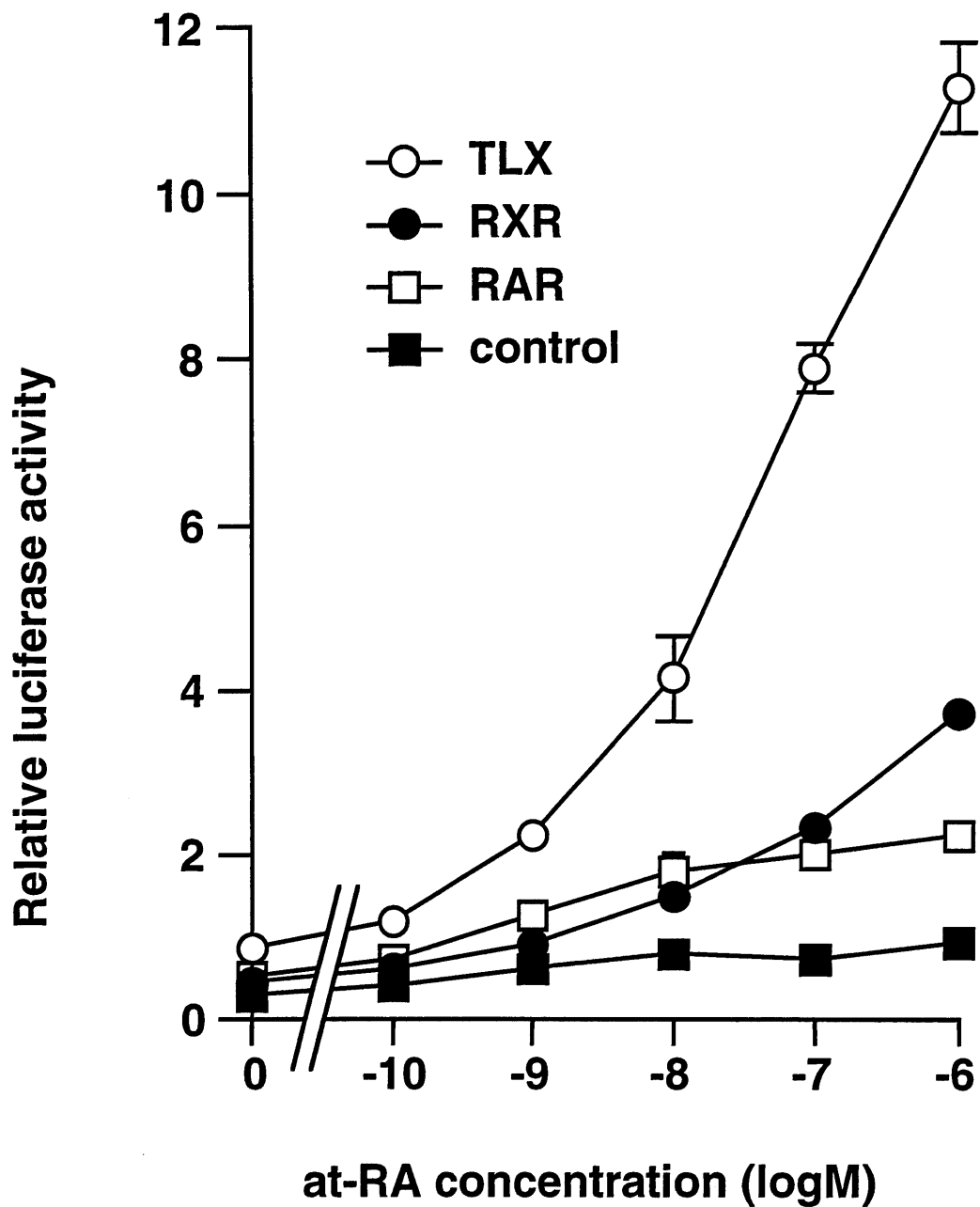


図 3.4 TLXによるRAR β 2プロモーターのat-RA応答性の向上

図 3.3 と同様のレポータープラスミドをCV-1細胞中に導入し、同時に様々なレセプター型転写因子を強制発現させてat-RAによる転写活性化を比べた。とりRAR β 2プロモーターはTLXを同時に強制発現させることによってRAに非常によく応答するようになる。

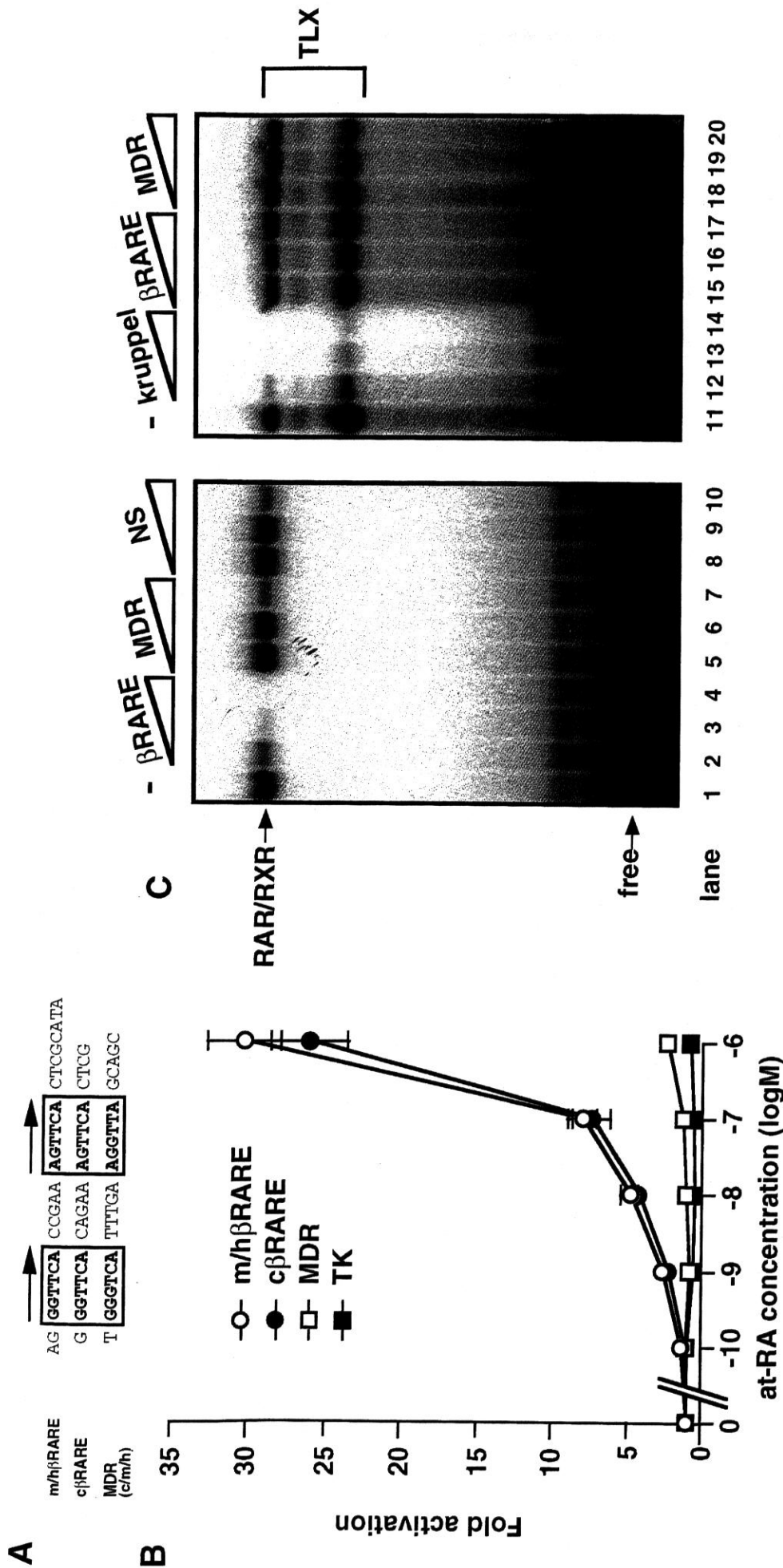


図3.6 MDR配列はRA応答性配列として作用しない

A, B) トリRAR β 2プロモーター上にある β RARE, MDRをTKプロモーターの上流に1コピー導入したプラスミドを作製し、初代培養のトリ神経網膜細胞中に導入してat-RAによる転写活性化を比べた。トリ β RAREはマウス β RAREと同様at-RAに非常によく応答するがMDRはat-RAに応答しない。

C) β RAREプロローブとRAR/RXRタンパク質(lane 11-10)あるいはkruppelプロローブとTLXタンパク質(lane 11-20)を用いたゲルシフト。lane 2-10は非標識の β RARE, MDR, NS(非特異的配列)オリゴヌクレオチドをそれぞれ1倍, 10倍, 100倍過剰に、lane 12-20は非標識のkruppel, β RARE, MDRオリゴヌクレオチドをそれぞれ4倍, 20倍, 40倍過剰に加えた競合実験。MDR配列にはRAR/RXR, TLXのいずれも結合しない。

しないということが判明した(図 3.6 C)。

これらの結果から、TLXとMDRの関係は、RAR/RXRとRAREとの関係とは状況が異なることが分かって来た。そこで次の試みとして、MDRと β RAREの両方をTKプロモーターの上流に組み込んだプラスミド(MDR- β RARE-TK-LUC)を作成してトリ神経網膜細胞、CV-1細胞に導入して検討したところ、トリ神経網膜細胞では β RARE-TK-LUCと同程度の強いat-RA応答能が観察されたのに対し、CV-1細胞ではMDR配列が存在することによってat-RA応答能が抑制され、RAR β 2プロモーターが持つ細胞種特異性を再構成することができた(図 3.7)。そこでCV-1細胞中で、MDRのみ、 β RAREのみ、あるいはMDRと β RAREの両方をTKプロモーターの上流に組み込んだプラスミドを用い、TLXとat-RAの効果を検討したところ、TLXの効果は、もともとat-RAに強く応答する β RAREがMDRと並んで存在することによりat-RA応答能が抑制され、TLXを強制発現することによって再びもとのレベルまでat-RAに応答できるようになっていると考えることができる結果を得た(図 3.8)。このことから、MDRは線維芽細胞CV-1ではRAR拮抗性サイレンサーとして機能し、TLXタンパク質がその脱抑制を行っているものと解釈できる。

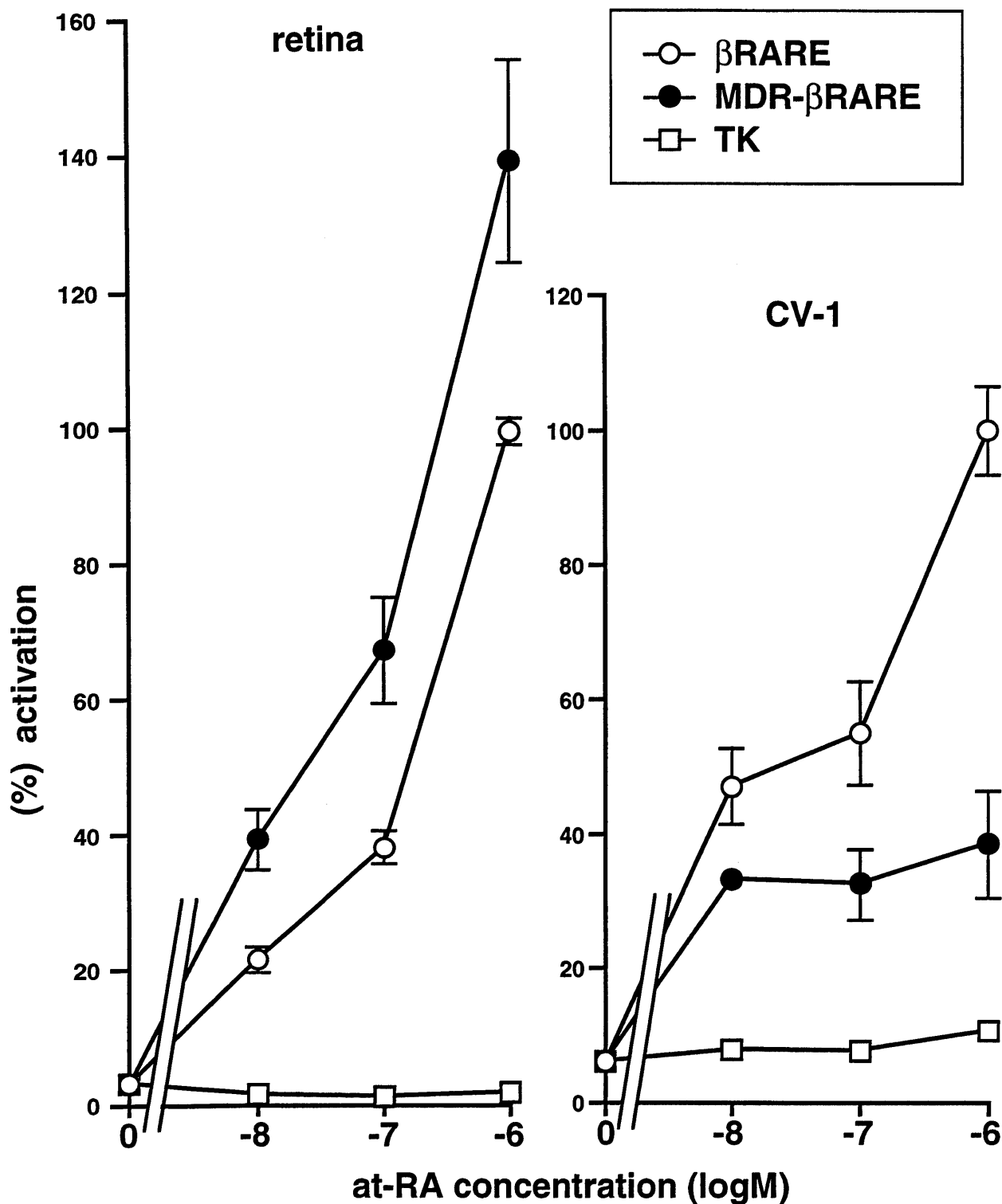


図 3.7 MDR配列はRAR β 2 プロモーターの細胞種特異性を担っている

トリRAR β 2 プロモーター上にあるMDRと β RAREの両方をTKプロモーターの上流に組み込んだプラスミドを作製し、初代培養のトリ神経網膜細胞、CV-1細胞中に導入してat-RAによる転写活性化を比べた。MDRは神経網膜細胞中では弱いRAREとして機能するが、CV-1細胞中ではRA応答能を抑制する。

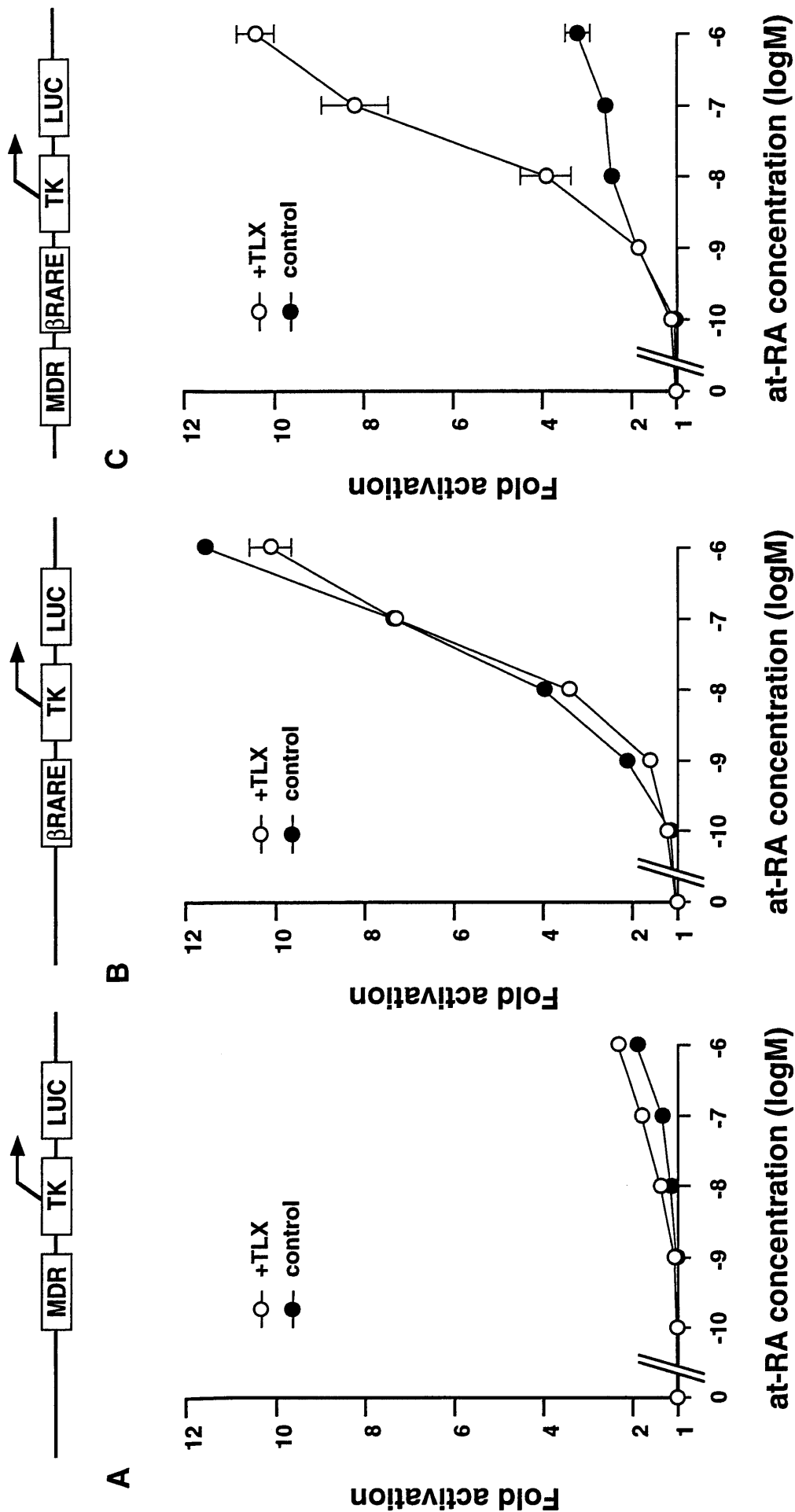


図3.8 TLXの強制発現によるRA応答性の向上

それぞれのグラフの上に模式的に示したレポータープラスミドをCV-1細胞中に導入し、同時にTLXを強制発現した場合のat-RA応答性を検討した。MDRがRAR拮抗性サイレンサーとして機能し、TLXタンパク質がその脱抑制を行っていることが示唆された。

3.2 ヒトTLXの同定と機能解析

3.2.1 ヒトTLXの同定

これまでの結果から、レチノイドシグナルに関与する転写活性化因子としてのTLXの機能が示唆されたため、さらにTLXに注目し、ヒトTLXの単離を試みた。トリTLX cDNAの部分配列をプローブとしてNCBI ESTデータベース(Altschul et al., 1990)中を検索し、ヒトESTデータベース中にトリTLXに類似した配列(GenBank accession number R18964, R43976)を見出した。この配列はいずれも73日目胎児脳に由来するam156j01というクローンの一部分であったため、このプラスミドを入手し、その構造を大谷ひふみさんと共同で解析した。その結果このプラスミドは、ヒトTLXコード領域の251番目のアスパラギン酸残基から下流の領域と、poly A配列を含む約1.3kbの3'非翻訳領域を含むことが明らかとなった(図3.9)。しかし、このプラスミドにはヒトTLXのN末端をコードする領域が欠けていたため、次にコード領域の全長を単離することを試みた。脊椎動物TLXの発現は非常に限局しており、TLXを発現している組織由来のヒトRNAを入手して5'-RACE法を行うことは困難であった。また、これまでヒト細胞株でもTLXの発現は報告されていない。そこで市販のヒト胎児脳(18週齢) cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングすることとした。

近年、約20塩基のビオチン化オリゴヌクレオチドをプローブとして目的のcDNAをスクリーニングする方法がLiらによって開発された(Li et al., 1995)。この手法を用いると、目的とするcDNAの情報が約20塩基のみでよく、また溶液中でライブラリーとのハイブリダイゼーションを行うため、非常に短期間(約3日)で 1×10^{11} 程度の大量のクローンをスクリーニングすることが出来るという利点がある。そこでこのシステムを当研究室で確立する意味も兼ねて、今回はこの方法を用いることとした。まず、現時点で判明しているヒトTLX cDNA配列の最も5'端を増幅できるようにNMO68とKMO14のプライマーセット(図3.9)を設計し、増幅される領域に19ヌクレオチドのプローブ(NMO63)を設計した。次にヒト胎児脳由来のcDNAライブラリーを鋳型に用いて上記プライマーセットを用いてPCRを行い、このライブラリー中にNMO63プローブとハイブリダイズする領域を含むヒトTLX cDNAクローンが存在することを確認した。続いて一本鎖状にした 4×10^{11} クローンのcDNAライブラリーとビオチン化したNMO63プローブを溶液中でハイブリダイズさせ、ストレプトアビジン-パラマグネティックビーズと磁石を用いて陽性クローンを濃縮した。次に、回収した一本鎖状陽性クローンをビオチン化していないNMO63プローブを用いて二本鎖に修復した。原理的にはこの修復過程はNMO63プローブに相補的な配列を持つクローンに対してのみ行われ、ここでも陽性クローンの選択が行われる。こうして得られた二本鎖のクローンを大腸菌を形質転換して10クローンを得た。PCR法を用いて検討した結果そのうち1クローン(クローンT2)がTLXの配列を含むことを確認した。なお、10クローン全てについてベクターの両方向から塩基配列を決定して解析した結果、TLXの配列を含むものはクローンT2のみであった。

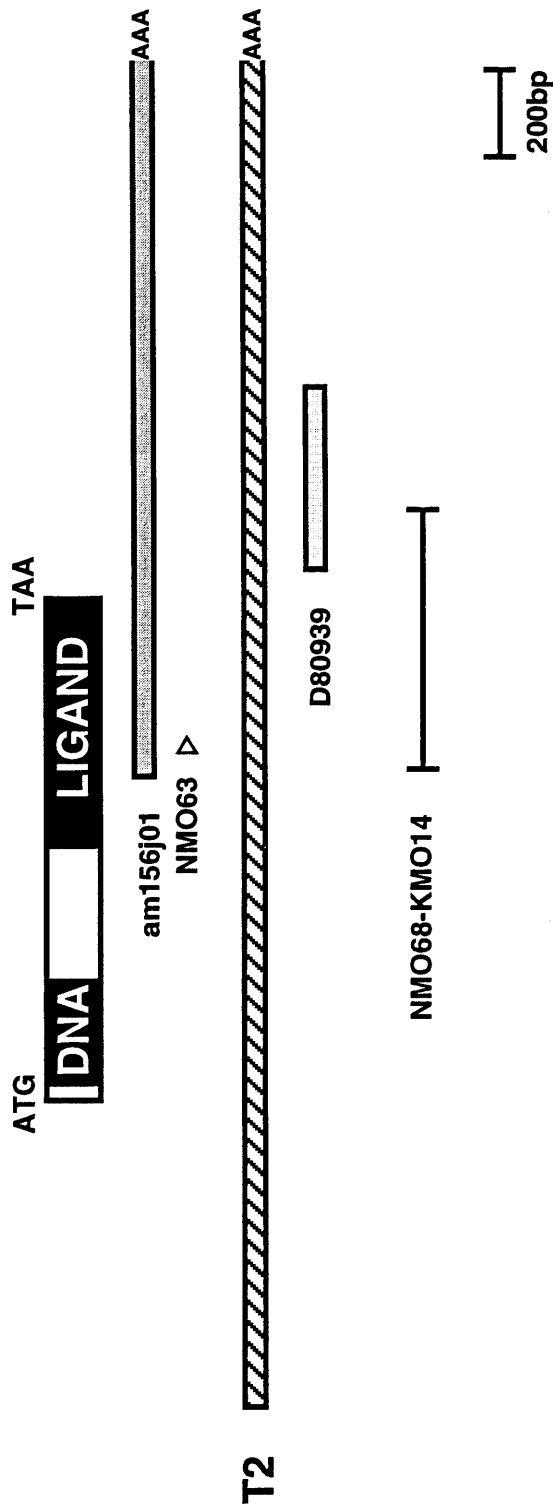


図 3.9 ヒト TLX cDNA の単離

ESTクローン am156j01の配列をもとにNMO63を設計し、これをプローブとしてヒト胎児脳ライブラリーより TLX cDNA全長を含むクローンT2を単離した。後にヒト TLX cDNAの一部をコードすることが判明した EST clone D80939の位置、ノザンブロットに用いたプローブ (NMO68-KMO14)の位置も合わせて示した。

3.2.2 ヒトTLXの構造

得られたcDNAは全長約3.2kbで、3'端にpoly A配列を含み、poly A付加シグナル配列の他、1155bpからなるオープンリーディングフレーム (ORF)を持つ。開始コドンと考えられるメチオニンコドンの約190bp上流にin frameの終止コドンが存在し、その間の領域にはin frameのメチオニンコドンは存在しない。また、クローンam156j01と重なる領域では塩基配列はほぼ完全に一致し、poly A配列が付加している位置も同じであった。ただし、3'非翻訳領域に見られるCAの繰り返し配列の数がクローンam156j01では24回であったのに対してクローンT2では25回であった。(図3.10)。予想されるタンパク質は385アミノ酸からなり、マウスTLXとは4アミノ酸、トリTLXとは8アミノ酸が異なるのみであり、進化的に良く保存されていることが判明した(図3.11A)。また、3'非翻訳領域では、約150塩基対に渡ってヒト・トリ間で約80%の相同性が見られる領域が3ヶ所存在するが、その機能は不明である(図3.10)。この解析を終えた後、再度ヒトTLXのcDNA配列を用いてESTデータベースを検索したところ、やはりヒト胎児脳に由来する約300bpの新たなクローンD80939の配列が3'非翻訳領域の配列と一塩基対を除いて完全に一致した(図3.9)。

3.2.3 転写因子としてのTLXの機能

今回得られたヒトTLXも、CV-1細胞中で強制発現させるとRAR β 2プロモーターのat-RA応答能を向上させることを確認した(図3.11B)。このように、TLXが直接結合するサイトを持たないプロモーターに対して、転写活性化因子として働きうるということがわかってきた。一方、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析から、TLLはギャップ遺伝子である*krüppel* 遺伝子の発現を抑制することが知られており(Hulskamp and Tautz, 1991)、*krüppel* 遺伝子の上流にはTLL/TLXが結合し得るAAGTCA配列を含む領域(以下*krüppel*配列と呼ぶ)が同定されている。トリTLXがこの配列に結合することは本研究でも確認した(図3.6)。そこでTLXがプロモーター上に直接結合する場合には転写抑制因子として機能するのだろうかを次に検討した。

CMVプロモーターはCV-1細胞中で、TKプロモーターに比べて約350倍強い基本的な転写レベルを持ち、抑制効果を検討するのに有効であると考え、*krüppel*配列をCMVプロモーターの上流に組み込んだルシフェラーゼのレポータープラスミドを作製してCV-1細胞に導入し、TLXを強制発現させた場合の効果を検討した(図3.12)。その結果、コントロールとして用いたCMVプロモーターのみのレポーターに対してもTLXは転写を抑制する傾向が見られたが、*krüppel*配列を持つレポーターに対してはさらに強力な、TLX濃度依存的な転写抑制が観察された。また、酵母GAL4タンパク質のDBDにTLXのLBDを融合させたタンパク質は、レポータープラスミドのGAL4結合サイトに依存してやはり転写抑制を行う(Ruth YU; 私信)。これらの結果から、プロモーター上にTLXが直接結合する場合、TLXは転写抑制因子として機能し得ることが示唆され、異なるプロモーターに対して見かけ上正反対の機能を発揮するというTLXタンパク質の興味深い性質が明らかとなった。

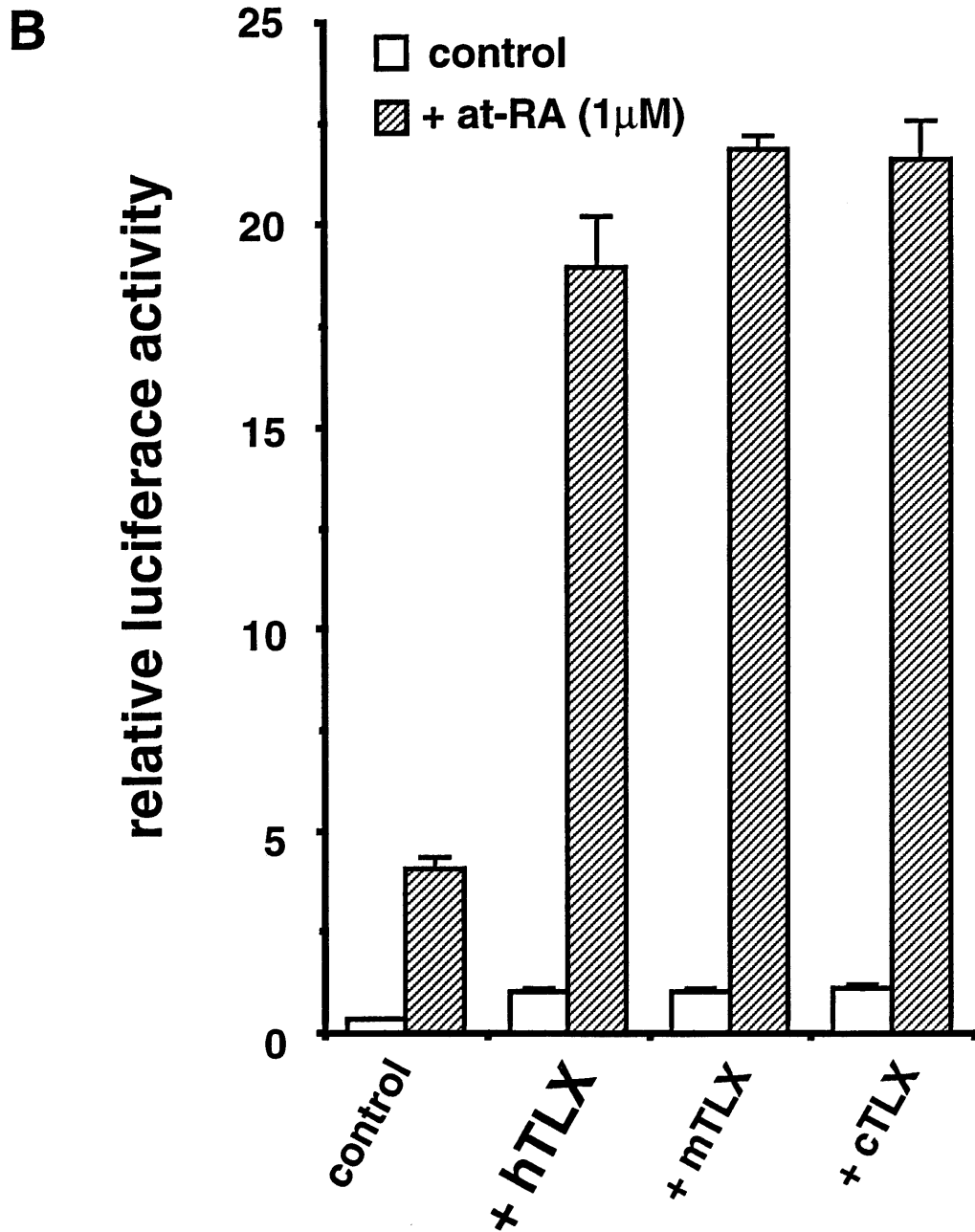
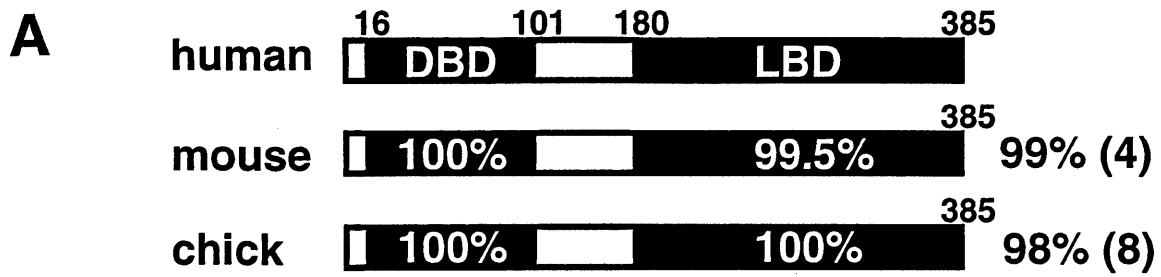


図 3.1 1 TLXの構造と機能は脊椎動物において保存されている。

A) TLXタンパク質は進化的に極めて良く保存されている。右側の数字は全アミノ酸残基でのヒトTLXに対する比較。括弧内の数字はヒトと異なるアミノ酸残基数を表す。
 B) ヒトTLXもCV-1細胞中でRAR β 2プロモーターのRA応答能を向上させる。

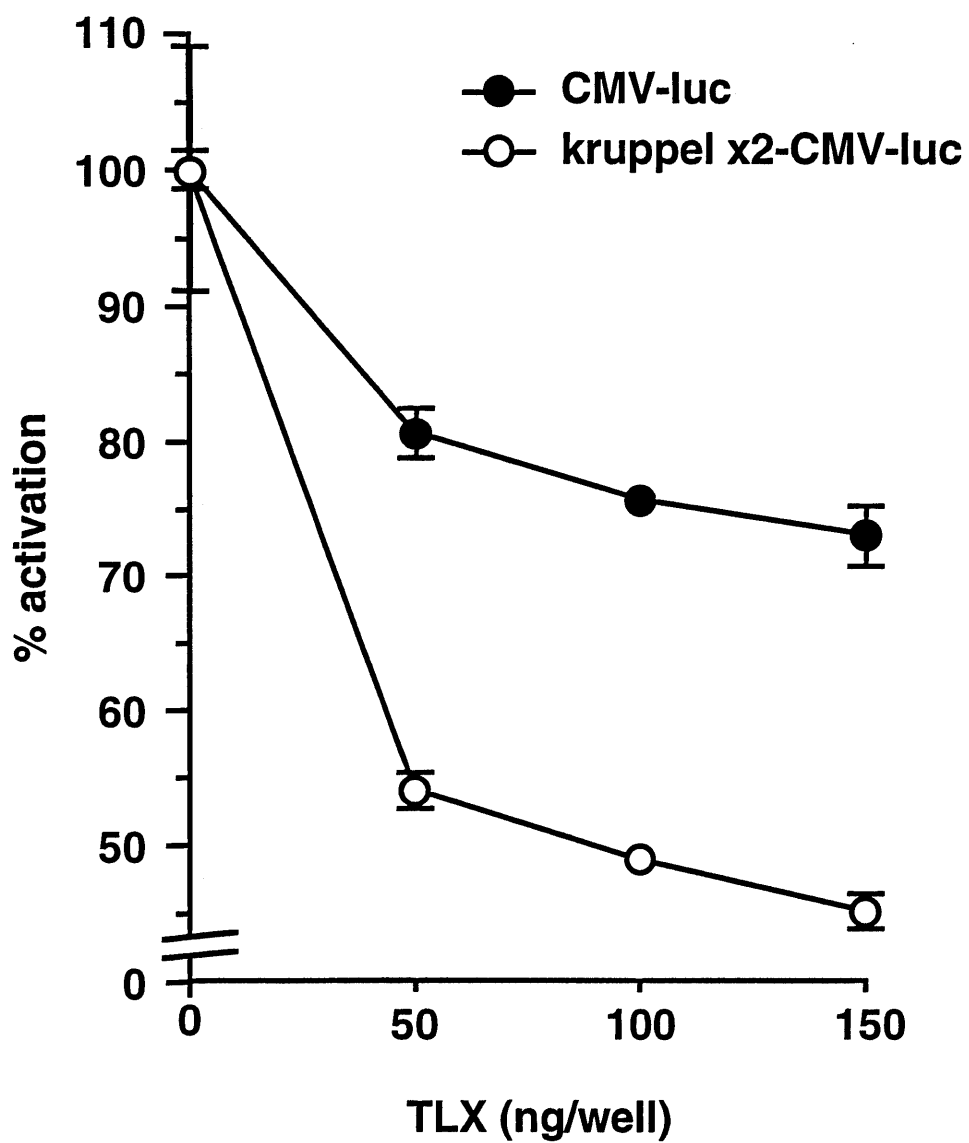


図 3.1 2 TLXによる転写抑制

TLXはTLX結合配列を持つレポーター遺伝子に対して抑制的に働く。

3.2.4 ヒト *TLX* の発現解析

これまで *TLX* の発現解析は胚を用いて行われたものが多く、成体での解析は進んでいない。そこで、ヒト成人各組織のRNAプロットを入手し *TLX* の発現パターンをノザンブロットで解析したところ、脳においてのみ約3.2kbの特異的なシグナルを認めた(図3.13)。この大きさは前述のクローンT2の大きさと一致する。そこでさらに脳の中で発現の分布を解析したところ、扁桃体・尾状核などの大脳辺縁系組織で強く発現しており、小脳由来の組織では発現がみられなかった(図3.14)。

胚においては *TLX* は増殖能を維持した未分化な神経前駆体細胞で高い発現が見られる。また、強制的に *TLX* を発現させた線維芽細胞は軟寒天中でも増殖が可能となることが知られている(Ruth YU; 私信)。そこで、ヒト癌細胞株において *TLX* の異所的な発現が見られる事例があるかどうかを検討することにした。様々な組織に由来するヒト細胞株20株について、RT-PCR法を用いて *TLX* の発現を検討したところ、神経上皮由来の細胞株 SK-N-MC の他に、結腸癌株(Caco-2)、アデノウイルスで形質転換した線維芽細胞株(293)でも強い発現が見られた(図3.15)。その他にも5細胞株で *TLX* 特異的な弱いシグナルを認めたが、それらの細胞株から全RNAを調製し、1レーンあたり20 μ gずつのRNAを泳動してノザンブロット法で解析した結果、SK-N-MC、Caco-2、293の3株のみで約3.2kbの *TLX* mRNA の発現を認めた(図3.15, データは示していない)。本来 *TLX* が発現していない組織に由来する細胞株における *TLX* の発現とその細胞増殖能との相関関係を解析することは今後の課題である。

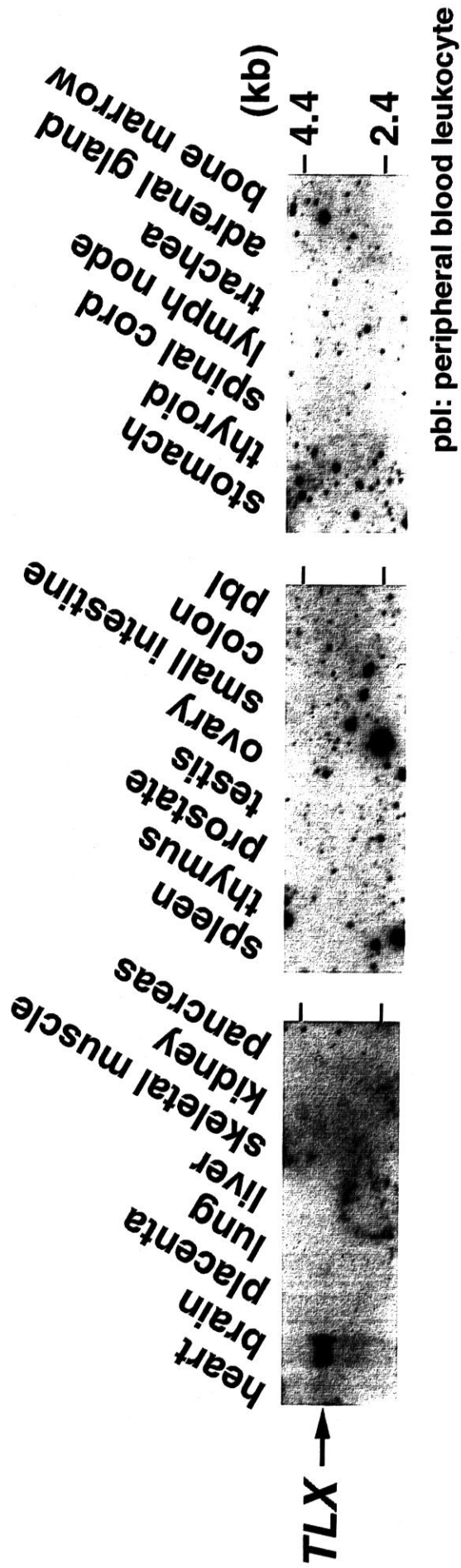


図3.13 ヒトTLXの脳特異的な発現

ヒト成体各組織でのTLXの発現をノザンブロットで解析した。TLXの発現は脳に特異的である。

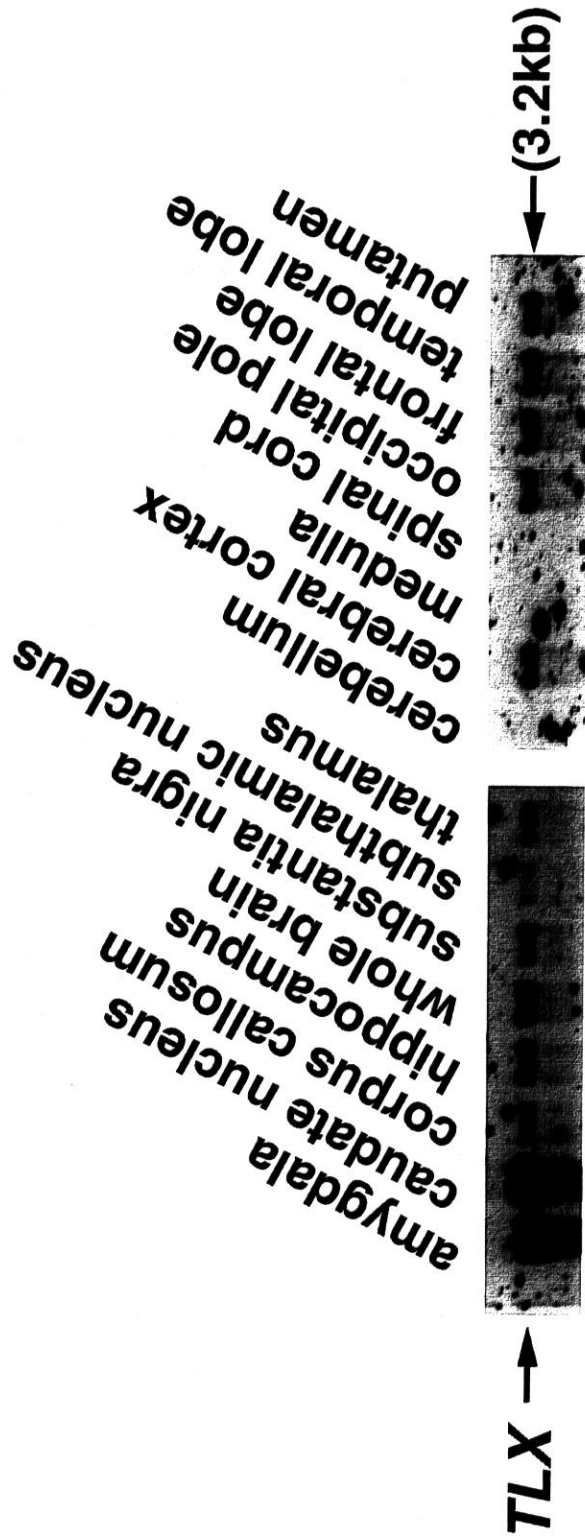


図3.14 ヒトTLXの脳各組織での発現

ヒト成体脳各組織でのTLXの発現をノザンブロットで解析した。TLXの発現は扁桃体(amygdala)や尾状核(caudate nucleus)など大脳辺縁系組織で強いが、小脳(cerebellum)などでは発現が見られない。

Origin	cell line	TLX	RAR α
Retinoblastoma	Y79	±	+
Neuroblastoma	SK-N-MC	+	+
Neuroblastoma	IMR-32	-	+
Glioblastoma	A-172	±	+
Epidermoid carcinoma	A-431	±	+
Cervical carcinoma	HeLa	-	+
Choriocarcinoma	JEG-3	±	+
Embryonic carcinoma	NT2/D1	-	+
Breast adenocarcinoma	MCF7	-	+
Ductal carcinoma, breast	T-47D	-	+
Hepatocellular carcinoma	Hep G2	-	+
Duodenum adenocarcinoma	HuTu 80	±	+
Colon adenocarcinoma	Caco-2	+	+
Colon adenocarcinoma	HT-29	-	+
E1A transformed fibroblast	293	+	+
Histiocytic lymphoma	U937	-	+
Promyelocytic leukemia	HL-60	-	+
Monocyte	THP-1	-	+
Erythroleukemia	HEL 92.1.7	-	+
Fibroblast (Monkey)	CV-1	-	+

図 3.15 TLXの細胞種特異的発現

ヒト細胞株でのTLXの発現をRT-PCR法を用いて解析した。強い発現が見られるものを+で、微かに発現が認められるものを±で示した。本来TLXの発現が見られる神経上皮由来の細胞株(SK-N-MC)の他、結腸癌(Caco-2)、アデノウイルスで形質転換した繊維芽細胞(293)等でも強い発現が見られる。RAR α をコントロールとして用いた。

3.3 新規核内レセプターPNRの同定

3.3.1 ヒトPNRの同定

まず体制の単純なプラナリアにおいて、頭部マーカー遺伝子探索の過程でTLX類似の核内レセプターをコードするcDNAが得られた。この配列でDBDをコードすると考えられる領域に縮重プライマーを設計し、RT-PCR法でショウジョウバエ胚で発現する遺伝子を検索したところ、TLLの他にTLLに類似したDBDをコードすると考えられる部分cDNA配列が見出された(梅園良彦；私信)。その配列を基にNCBI ESTデータベース(Altschul et al., 1990)中を検索した結果、TLXに類似しているが、明らかに異なるタンパク質をコードすると考えられる、ヒト成体網膜に由来するcDNA配列(W27871)を見いだした(図3.16)。この配列から予想されるタンパク質(後にPNRと命名した)は標的塩基配列の認識に重要なP boxの最初のアミノ酸残基がアスパラギン残基(N)となっている。これまで脊椎動物で同定されている核内レセプターでは、糖質コルチコイドレセプター等の4種のステロイドホルモンレセプターがこの位置にグリシン残基(G)を持つ他は、全ての核内レセプターで酸性アミノ酸残基であるグルタミン酸残基(E)もしくはアスパラギン酸残基(D)となっている(図3.17)。またP boxの4番目のアミノ酸残基がセリン残基(S)となっているものはこのPNRの他にはTLXのみであり、他の核内レセプターは全てこの位置にリジン残基(K)を持っている(図3.17)。実際人為的にこれらの位置のアミノ酸残基を置き換えることで、標的配列の特異性が大きく変化することが知られており(Zilliagus et al., 1994)、これらのことからPNRタンパク質はこれまで核内レセプターの標的配列として知られていた塩基配列とは全く異なる新しいタイプの標的配列を認識する可能性が高く、PNRの最も重要な特徴と考えられる。以上述べてきたように、TLXの発現が見られる網膜で、TLXに類似しているが新たな特徴を持つ核内レセプターが同時に発現している可能性が示唆されたため、この転写産物(PNR)の単離を試みた。

まずW27871の塩基配列をもとにプライマーNMO70とNMO71を設計した。W27871の配列は特に3'側において塩基配列の読み間違いが多く見られるため、下流側のNMO71プライマーは、核内レセプターで比較的保存度の高い、P box直後のFFKRSVというアミノ酸残基のコドンに合うように設計した(図3.16, 3.17)。次に、RT-PCR法を用いて、前述のTLXの発現を検討したヒト腫瘍細胞株20株(図3.15)をスクリーニングした結果、網膜芽腫細胞株Y79でのみ発現を認めた(データは示していない)。そこでY79細胞からRNAを抽出し、RACE法によってcDNAの全長を単離することとした。

まず3'-RACE法を用いることとし、T3プロモーター配列をもつオリゴdTプライマーをアンカープライマーとして用いてcDNAを合成した。このDNAを鋳型に、一回目としてKMO4とT3プライマーを用いて30サイクルのPCRを行い、反応物の1/50を二回目のPCRの鋳型に用いて、NMO70とT3のプライマーセットで23サイクルのPCRを行った(図3.18)。その結果poly-A+領域を含む約1.8kbの特異的な断片が増幅され、これをサブクロー

```

GGAATCACCAGGGGAGACAGNGCACAGNGAGACAGAGGTTTCATGGACTGAGGCAAAGGCTGGGCCAGGCTCAGCAACCCAGGCCTCCCG 90
G I T R G D R X T X R Q R F M D . G K G W A R L S N P G L P
E S P G E T G A Q X D R G S W T E A K A G P G S A T Q A S R
N H Q G R Q X H X E T E V H G L R Q R L G Q A Q Q P R P P A

CAGGCAGGCAGAGGCTGCCCTGTAACCCATGGAGACCAGACCAACAGCTCTGATGAGCTCCACAGTGGCTGCAGCTGCCCTGCAGCTGG 180
Q A G R G C P V T H G D Q T N S S D E L H S G C S C A C S W
R Q A E A A L . P M E T R P T A L M S S T V A A A A P A A G
G R Q R L P C N P W R P D Q Q L . . A P Q W L Q L R L Q L G

GGCTGCCCTCCAGGAAGGAGTCTCCAGGCAGATGGGGCCTGGGGGAGGATCCACAGGCGTGAGCCCTCGCTCCAGTGGCCGGTGTGGCGG 270
G C L Q E G V S R Q M G P G G G S H R R E P L A P V P R V R
A A S R K E S P G R W G L G E D P T G V S P S L Q C R V C G
L P P G R S L Q A D G A W G R I P Q A . A P R S S A A C A E

DNA binding domain
P box NMO 71
AGACAGCAGCAGCGGGAAGCACTATGGCATCTATGCCCTGCAACGGTTGCAGCGGTTTCTTCCAAGAGGAGCNGTACGGNGGAGGCTCAA 360
R Q Q O R E A L W H L C P A T V A A V S S K R S X T X E A Q
D S S S G K H Y G I Y A L D R L Q R F L P R G A V R X R L N
T A A A G S T M A S M P C N G C S G F F Q E E X Y G G G S I

D box
TCCATACAAGGGTGCAGGAGTGGGGCAGGGATTGTGCCCCCCNGTGGACAAGGNCACCCGNAACCCAGTGCAGGCTGCCCGG 450
S L Q G C P G W G Q G L C P P V D K X P T R N P V P R P A G
P Y K G A Q G G G R D C A P X W T R X Q P X T Q C P G L P X
L T R V P R V G A G I V P P X G Q G P N P X P S A Q A C R X

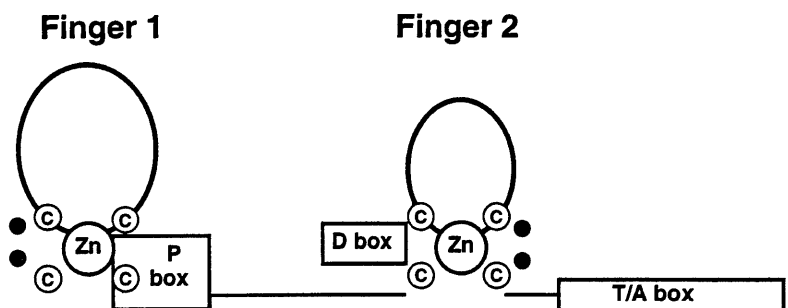
TTGAGAAGTGCTTNAAAAANNNGGNGGGNTTGAACCCAGGACGCCCGTNNAAAGGAACGANNGCCNAGCCCGNGAGGANAAGCCAGGT 540
L R S A X K X G X G L N P G R P X K G T X A X P X R X S P G
. E V L X X X X G X . T Q D A R X K E R X P S P X G X A Q V
E K C X K X X X G X E P R T P V X R N X X X A R E X X K P R X

NCCACCCCTGGANAAGAATNNNN 563
X T P G X E X
P P L X K N X
H P W X R X X

```

図3.16 ヒトESTクローンW27871の配列

DNA結合領域様の構造を持つ領域を影を付けて、ORFをコードすると予想されるアミノ酸配列を下線で、2つのZnフィンガーモチーフを構成するのに重要な8つのシステイン残基を太字で、P box中で特に注目したアスパラギン残基を二重下線で、P box、D boxを四角で囲って、細胞株のPCRスクリーニングに用いたプライマーを矢印で、それぞれ示した。ただしNMO71プライマーは、アミノ酸残基のコドンが合うように、下線を付けた塩基を除いて設計した。



	P box
PNR	CNGCSGFFKRSVRRR
TLX	CDGCSGFFKRSIRRN
HNF4a	CDGCKGFFRRSVRKN
HNF4g	CDGCKGFFRRSIRKS
COUP/EAR3	CEGCKSFFKRSVRRN
ARP-1	CEGCKSFFKRSVRRN
EAR2	CEGCKSFFKRTIRRN
TR2-11	CEGCKGFFKRSIRKN
TR4	CEGCKGFFKRSVRKN
RXRa	CEGCKGFFKRTVRKD
RXRb	CEGCKGFFKRTIRKD
RXRg	CEGCKGFFKRTIRKD
RORa	CEGCKGFFRRSQQSN
RORb	CEGCKGFFRRSQQNN
RORg	CEGCKGFFRRSQRCN
Rev-erba	CEGCKGFFRRSIQQN
Rev-erbb	CEGCKGFFRRSIQQN
Ad4BP	CESCKGFFKRTVQNN
GCNF/RTR	CEGCKGFFKRSICKK
RARa	CEGCKGFFRRSIQKN
RARb	CEGCKGFFRRSIQKN
RARg	CEGCKGFFRRSIQKN
TRa	CEGCKGFFRRTIQKN
TRb	CEGCKGFFRRTIQKN
VDR	CEGCKGFFRRSMKRK
PPARa	CEGCKGFFRRTIRLK
PPARb	CEGCKGFFRRTIRMK
PPARg	CEGCKGFFRRTIRLK
LXRa	CEGCKGFFRRSVIKG
LXRb	CEGCKGFFRRSVVRG
FXR	CEGCKGFFRRSITKN
CAR	CEGCKGFFRRTVSKS
NURa	CEGCKGFFKRTVQKN
NURb	CEGCKGFFKRTVQKN
NURg	CEGCKGFFKRTVQKN
ERR1	CEACKAFFKRTIQGS
ERR2	CEACKAFFKRTIQGN
ERa	CEGCKAFFKRSIQGH
ERb	CEGCKAFFKRSIQGH
<hr/>	
GR	CGSCKVFFKRAVEGQ
MR	CGSCKVFFKRAVEGQ
AR	CGSCKVFFKRAAEGK
PR	CGSCKVFFKRAMEGQ



図 3.17 ヒト核内レセプターのDNA結合ドメイン(P box)

PNRのP boxは脊椎動物の核内レセプターの中で初めて同定されたタイプである。

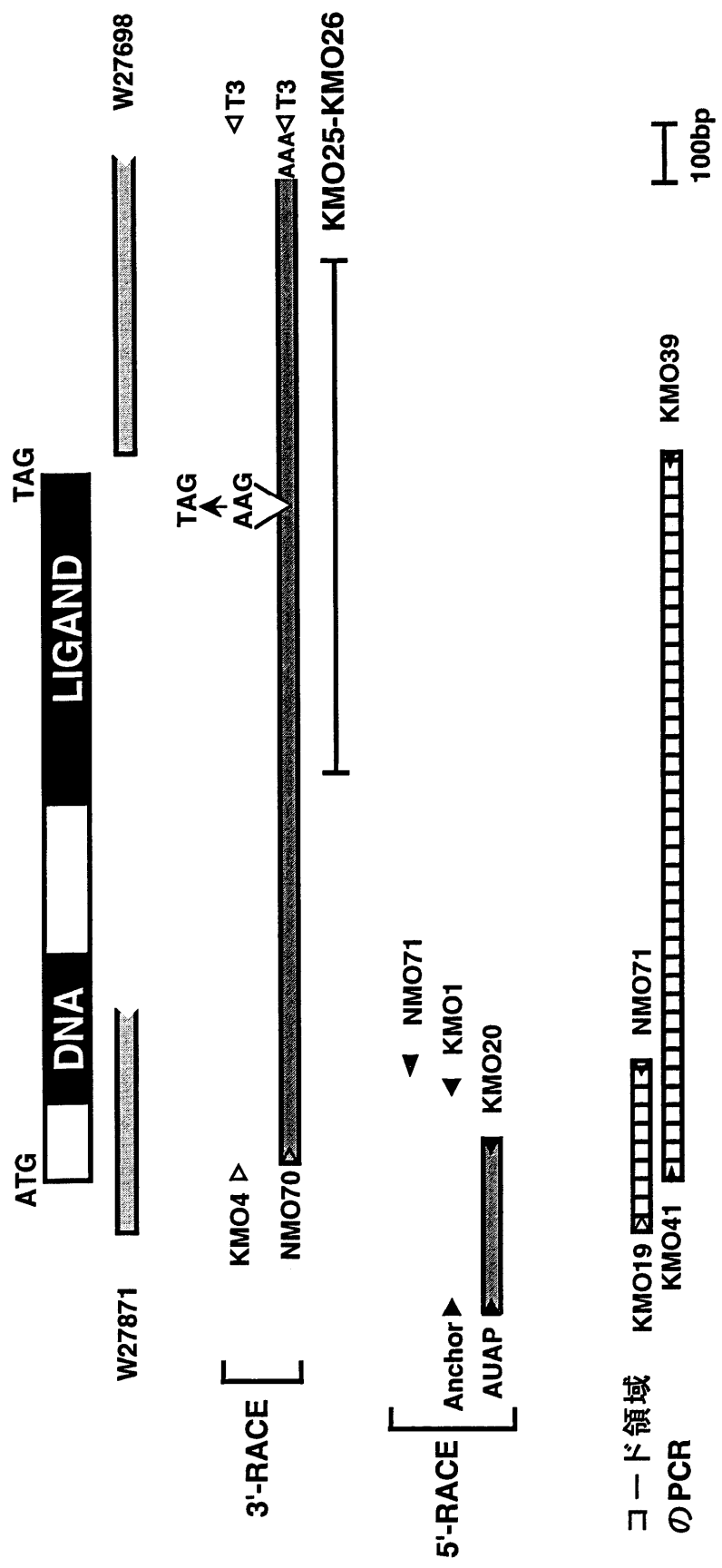


図 3. 1 8 ヒト PNR cDNA の単離

EST clone W27871 の配列をもとに 3'-RACE、5'-RACE を行い、最後にコード領域を PCR してヒト PNR cDNA の塩基配列を決定した。EST clone の端が閉じていない部分は配列の解読が困難な部分を示す。3'-RACE で単離されたクローン M3 で見られた in frame 終止コドンの位置を AAG → TAG で示し、この変異が Y79 細胞で見られるかどうかを確認するために行った PCR 反応で増幅される領域 (KMO25-KMO26)、後にヒト PNR cDNA の一部をコードすることが判明した EST clone W27698 の位置、PCR に用いた各プライマーの位置も合わせて示した。DNA、DNA 結合領域; LIGAND, リガンド結合領域; Anchor, 5'-RACE Abridged Anchor Primer; AUAP, Abridged Universal Amplification Primer。

ニングして3クローン(M1、M2、M3)の部分塩基配列を決定したところ、クローンW27871と重なる部分約360塩基対について90%以上の塩基配列が一致した。ただし、クローンM3では、予想される転写産物の393番目のリジンコドンに相当する位置に、in frameの終止コドンが導入されていた(図3.18, 3.19)。クローンM1、M2ではこの領域に相当する部分の塩基配列が不明であったため、Y79細胞ではこの転写産物は全てこの位置に終止コドンが存在するのかどうかをまず確かめることにした。そこでこの領域を含む約850bpの断片を増幅できるようにプライマーKMO25とKMO26を設計(図3.18)し、Y79細胞から調製したcDNA、クローンM2、M3それぞれを鋳型としてPCRを行った。次にその増幅断片を、CTAG配列を特異的に認識して切断する制限酵素BfaI (NEB)で切断し、3.0%のNuSieve GTG agarose (FMC)ゲルで泳動してバンドパターンを検討した結果、この位置にCTAG配列を持つのはクローンM3のみであることが判明し、この変異はRACE反応中に導入されたに過ぎないと判断した。続いて、NMO71をcDNA合成用アダプターとして、KMO1、KMO20を標的転写産物特異的プライマーとして用いた5'-RACEを行い、cDNAの5'-端を決定した(図3.18)。

今回のクローンM3でも見られたように、RACE法では50サイクルを越えるPCR反応を行ってcDNA断片を増幅するため、その過程でしばしば配列に変異が導入されるという欠点がある。そこでコード領域の塩基配列を確定するために、KMO19とNMO71のセットで1クローン、KMO41とKMO39のセットで独立のcDNA合成反応からのPCRクローン2クローンをサブクローニングして、コード領域の全塩基配列を決定した(図3.18, 3.19)。KMO41とKMO39のPCRで得られた2クローン(H3-6、H7-9)間の配列は2塩基が異なっていたが、その2塩基は3'-RACEで得られた3クローンではH7-9と同じ塩基であったため、H7-9の配列をこの転写産物の本来の配列と考えた。

3.3.2 ヒトPNRの構造

得られたcDNAは全長約2.0kbで3'端にpoly A配列を含み、poly A付加シグナル配列の他、1230bpからなるORFを持ち、開始コドンと考えられるメチオニンの前に、in frameで終止コドンが存在する(図3.19)。このORFから予想されるタンパク質は410アミノ酸からなり、大きさは約44.7kDと考えられる(図3.19)。また、核内レセプターに特徴的なDBD、LBD様の構造を持ち、以下に述べる発現領域の特異性から、このタンパク質をPNR (photoreceptor-specific nuclear receptor) と名付けた。

PNRは構造的には核内レセプターの中でもTLXに最も類似しており(図3.20)、当初に予想したとおり、標的塩基配列の認識に重要なP boxの最初のアミノ酸残基にアスパラギン残基(N)を持つという新たな特徴を持つが、PNRの標的配列特異性に関しては、別の章(3.5)において詳しく解析する。CLUSTAL W Multiple Sequence Alignment Program (Thompson et al., 1994)を用いて、LBDの構造をもとに核内レセプターの系統樹を作ると

AGAAATCTCCTAAAGCCAGAGCCTGTGCTGTGAGGGGCTTCGGGACCTTGGGGCAGCTCCTGAGTTCAGACAGAGTTCAGGAAGGGAG 88

ACAGGGGCACAGAGACAGAGGTTTCATGGACTGAGGCAAGGCTGGGCCAGGCTCAGCAACCCAGGCTCCCGCAGGCAGGCAGAGGCT 178

GCCCTGTAACCATGGAGACCAGACCAACAGCTCTGATGAGCTCCACAGTGGCTGCAGCTGCGCCTGCAGCTGGGGCTGCCTCCAGGAAG 268

M E T R P T A L M S S T V A A A A P A A G A A S R K 26

GAGTCTCCAGGCAGATGGGCTGGGGAGGATCCACAGCGTGGAGCCCTCGCTCCAGTCCCGGTGTGGCGGAGACAGCAGCAGCGGG 358

E S P G R W G L G E D P T G V S P S L Q C R V C G D S S S G 56

AAGCACTATGGCATCTATGCCTGCAACGGCTGCAGCGGCTTCTTCAAGAGGAGCGTACGGCGGAGGCTCATCTACAGTGGCAGGTGGGG 448

K H Y G I Y A C N G C S G F F K R S V R R R L I Y R C Q V G 86

GCAGGGATGTGCCCGTGGACAAGGCCACCGCAACAGTGCCAGGCTTCGGCGTGAAGAAGTGCCTGCAGGCGGGATGAACCCAGGAC 538

A G M C P V D K A H R N Q C Q A C R L K K C L Q A G M N Q D 116

GCCTGCAGAACGAGCGCCAGCCGCAAGCAGCCAGGTCCACCTGGACAGCATGGAGTCCAACTGAGTCCCGGCCGAGTCCCTG 628

A V Q N E R Q P R S T A Q V H L D S M E S N T E S R P E S L 146

GTGGCTCCCCGGCCCGGCGAGGGCGCAGCCACGGGCCCCACCCATGCTGCAGCCAGAGCCCTGGGCCACCACTTCATGGCCAGC 718

V A P P A P A G R S P R G P T P M S A A R A L G H H F M A S 176

CTTATAACAGCTGAAACCTGTGCTAAGCTGGAGCCAGAGGATCTGATGAGAATAATTGATGTCACCAGCAATGACCCCTGAGTTCCTCC 808

L I T A E T C A K L E P E D A D E N I D V T S N D P E F P S 206

TCCTCATACTCTCTTCTCCCTCCCGCTGGCCCTGGACAGCATCCATGAGACCTCGGCTCGCCTACTCTTCATGGCCGTCAGTGGCCAA 898

S P Y S S S S P C G L D S I H E T S A R L L F M A V K W A K 236

AACCTGCCTGTGTCTCCAGCCTGCCCTTCGGGATCAGTGTGCTGCTGGAGAGGCGTGGAGTGAAGTCTTTCTCCTCGGGGCCATC 988

N L P V F S S L P F R D Q V I L L E E A W S E L F L L G A I 266

CAGTGGTCTCTGCTCTGGACAGCTGTCTCTGCTGGCACCGCCGAGGCTCTGCTGCCGGTGGTGGCCAGGGCCGCTCAGCCTGGCC 1078

Q W S L P L D S C P L L A P P E A S A A G G A Q G R L T L A 296

AGCATGGAGACCGGTGTCTGCAGGAACTATCTCTCGGTTCCGGGCAATGGCGGTGGACCCACGGAGTTTGCCTGCATGAAGGCCTTG 1168

S M E T R V L Q E T I S R F R A L A V D P T E F A C M K A L 326

GTCTCTTCAAGCCAGACGCGGGGCTGAAGGATCCTGAGCAGTAGAGGCTTCGAGGACCAAGTGCATGCTGAGCCAGCAC 1258

V L F K P E T R G L K D P E H V E A L Q D Q S Q V M L S Q H 356

AGCAAGGCCACCACCCAGCCAGCCCGTGAAGTTTGGGAAATGCTCTGCTCCTCCCGTCTTTGAGGTTTATCACTGCGGAACGCATC 1348

S K A H H P S Q P V R F G K L L L L P S L R F I T A E R I 386

GAGTCTCTTTTCCGCAAGACCATAGGAATACTCCAATGGAGAAGCTCCCTTTGATATGTTCAAAAAGTGGGGGTGGAGGTGA 1438

E L L F F R K T I G N T P M E K L L C D M F K N * 410

AATGTTTCCAAGCACTCTGGAAAACAATCTACTGAAACGAAACAATTTGCTACTCTTTGCCCCAGCAATTCCTCGTAGGTGTGTACCT 1528

AGCAGAAATGCCACCAGAAAGATATTGTAAGAATAATTCNNAGCAGCTTTAATTCATAATAGCCCCAAACTGTATATTGATGGTAGGATGAA 1618

TTAACAAGTTGGTATATTTCATATAATGAAAAATAATTTAAAAAGAATGAATTACGGATACATGTGGCAACACAGGTAATACTACACAGA 1708

CATAAAAAGTTGAATGAAAGAAGCCAGGCCGAAGTTCATTTATGCAGAGTTCAGGAACAGGCAAGACTAATTGACAATAATAGAAGTTGG 1798

AATAGTGGTTACTTCTGGGTGGTGGGGATTGATACAGAGGGGCTCATGGGAGCCYCTTGGTGTACCAGAAATGTTGATTTTGTATCTGG 1888

GCAGTGGTTTCAAAATGATTTTCATACGTAATAATTCATTGRGCTGTGCGCYTTTATTTTGTAGACCTCAATAAAAAAAGTTAAAAA 1978

AAAACAAAAAACCCAGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2020

図 3.19 ヒト PNR cDNA の全塩基配列と予想されるアミノ酸配列

DNA結合領域、リガンド結合領域、開始コドンの直前にある in frame の終止コドン、ポリA付加シグナル配列をそれぞれ黒矢印、白矢印、四角で囲って、下線で示した。また、コード領域中に存在するイントロンA-Gの位置とゲノムDNAを鋳型としたPCRに用いたプライマーの位置、それにクローンM3で見られたBfaIサイトを示した。

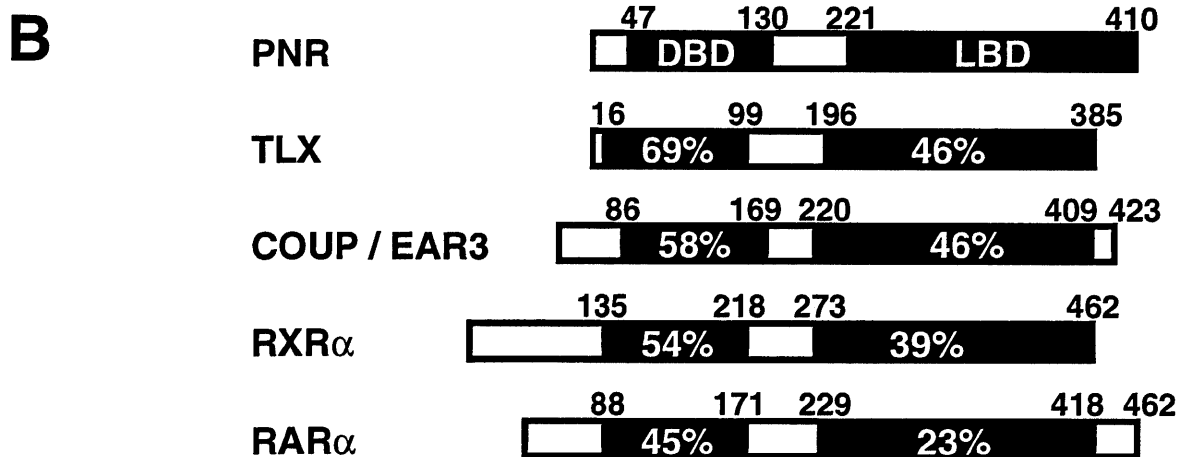
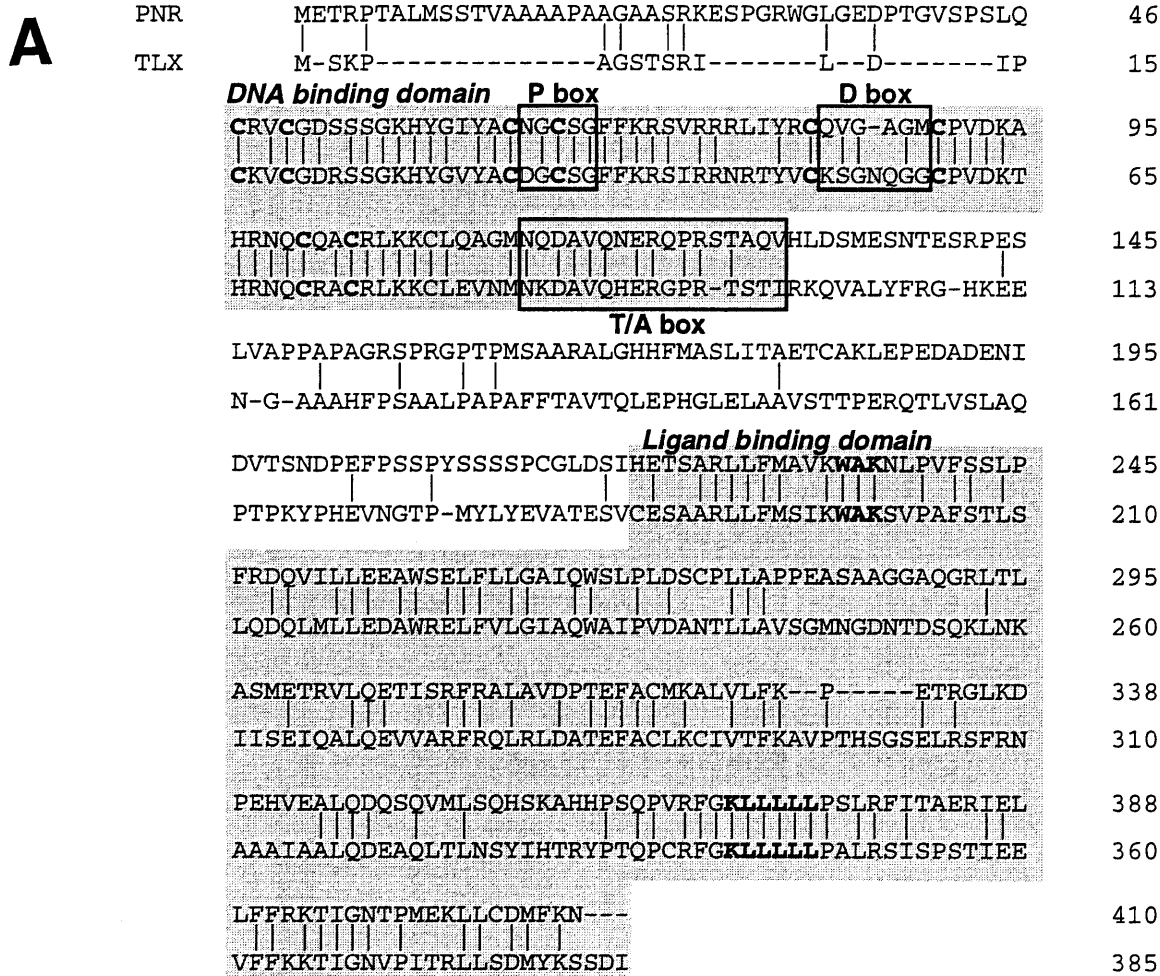


図 3.20 ヒトPNRとTLXタンパク質の構造比較

A) PNRは核内レセプターの中でTLXと相同性が最も高い。しかし、標的配列認識に重要なP box、D box、T/A boxの構造は異なる。DNA結合領域(DBD)、リガンド結合領域(LBD)を影で、P box、D box、T/A boxを四角でそれぞれ示した。またDBD中で2つのZnフィンガーモチーフを構成するのに重要な8つのシステイン残基と、LBD中で核内レセプターに特徴的なペプチドモチーフをそれぞれ太字で示した。

B) PNRタンパク質と他の核内レセプターとの比較

PNRはRXRやCOUP、HNF4など、ホモ二量体を形成して標的配列に結合するタイプのオーファンレセプターに近縁であることが判明した(図3.21)。このグループは、ステロイドレセプターやRARよりも進化的に起源が古いと考えられており、その相同タンパク質が線虫やショウジョウバエにも見出せるという特徴も持っている(Mangelsdorf et al., 1995)。PNRとTLXの距離はRARやRXRなどで見られるようなサブタイプ間の距離よりもかなり遠く離れており、PNRとTLXはお互いにサブタイプの関係にあるというよりは異なる遺伝子と考えた方が妥当である。

3.3.3 脊椎動物におけるPNR遺伝子の保存

これまで述べてきたように、PNRはこれまでに知られていなかった全く新しいタイプの核内レセプターであるため、次に他の脊椎動物でもPNR遺伝子が存在するのかどうかを検討した。ヒトPNR cDNA(アミノ酸残基248から410に相当する領域)をプローブに用い、脊椎動物のゲノムDNAに対してサザンブロットを行ったところ齧歯類や犬、牛で特異的なシグナルが検出され、PNR遺伝子が他の脊椎動物にも存在することが示唆された。しかし、ウサギ、トリでは弱いシグナルしか検出出来なかった(図3.22)。このことから、TLXではヒト・トリ間でその構造が非常に高い保存度を示しているのとは状況がかなり異なっていることが予想された。

3.3.4 PNRの発現解析

新たに得られたヒトPNRのcDNA配列を用いて再度ESTデータベースを検索したところクローンW27871に加えて、やはりヒト成体網膜のライブラリーに由来するクローンW27698がPNRの3'非翻訳領域をコードしていることが判明した(図3.18)。次にヒトPNRのDBDをプローブに用い、Y79細胞から抽出したpoly-A+ RNAに対してノザンブロットを行ったところ、約2.0kbの特異的なシグナルを検出することが出来た(図3.23A)。この大きさは、先に決定したヒトPNR cDNAの長さとも一致する。しかし、次にTLXの発現解析で用いたものと同様の、ヒト成体各組織に由来するRNA(図3.13)に対してノザンブロットを行ったところ、シグナルを検出することが出来なかった(データは示していない)。そこで、20種の細胞株(図3.15)の中でも網膜由来のY79でしか発現が見られなかったことと、ESTクローンW27871、W27698がいずれも成体網膜のライブラリーに由来するという二点から、PNRの発現は網膜に非常に特異的なのではないかと考えた。ヒト網膜RNAを入手することが出来なかったため、ラットで網膜を含む成体各組織に由来するRNAを入手して、ヒトPNRのLBDをプローブに用いてノザンブロットを行ったところ、実際にPNRは網膜に限って発現が見られる核内レセプターであることが明らかとなった(図3.23B)。

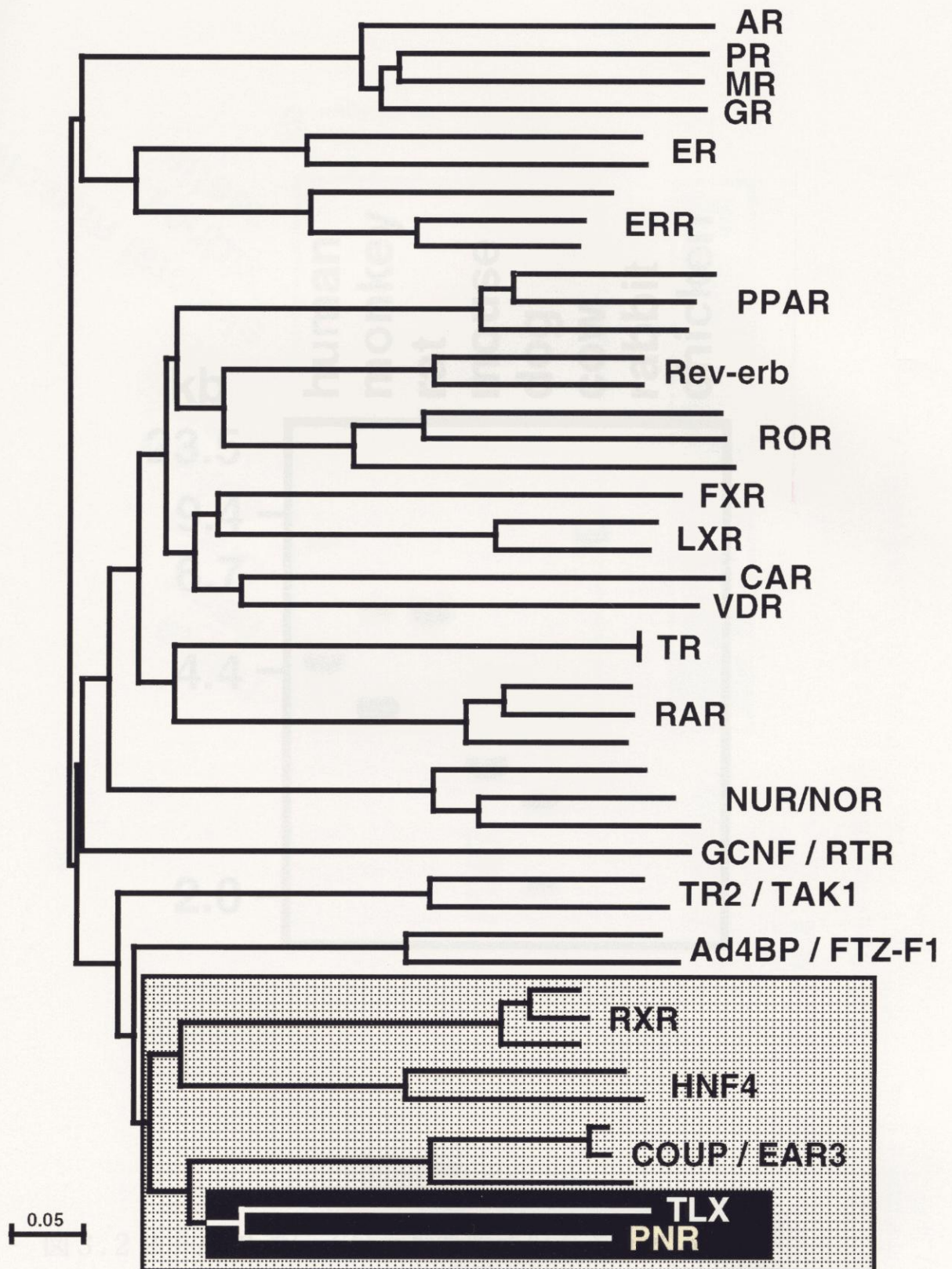


図3.21 核内レセプターファミリーにおけるPNRの位置づけ

NJ法を用い、LBDのアミノ酸配列をもとにして系統樹を作製した。PNRはTLXに最も類似しており、RXRやCOUP/EAR3などホモ二量体を形成して標的塩基配列に結合するタイプのレセプター群に比較的近い。

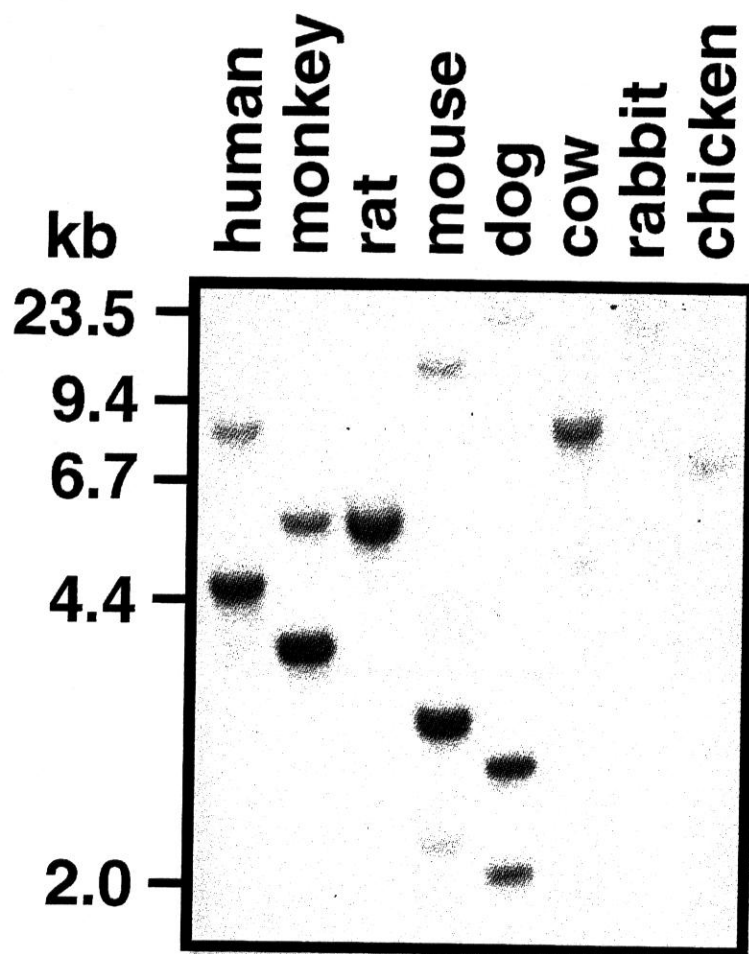


図 3.2 2 *PNR* 遺伝子は脊椎動物で保存されている

ヒト *PNR* cDNA をプローブに用い、上に示した動物のゲノム DNA に対してサザンブロットを行った。*PNR* 遺伝子は他の脊椎動物にも存在することが示唆されたが、ウサギ、トリでは弱いシグナルしか検出できなかった。

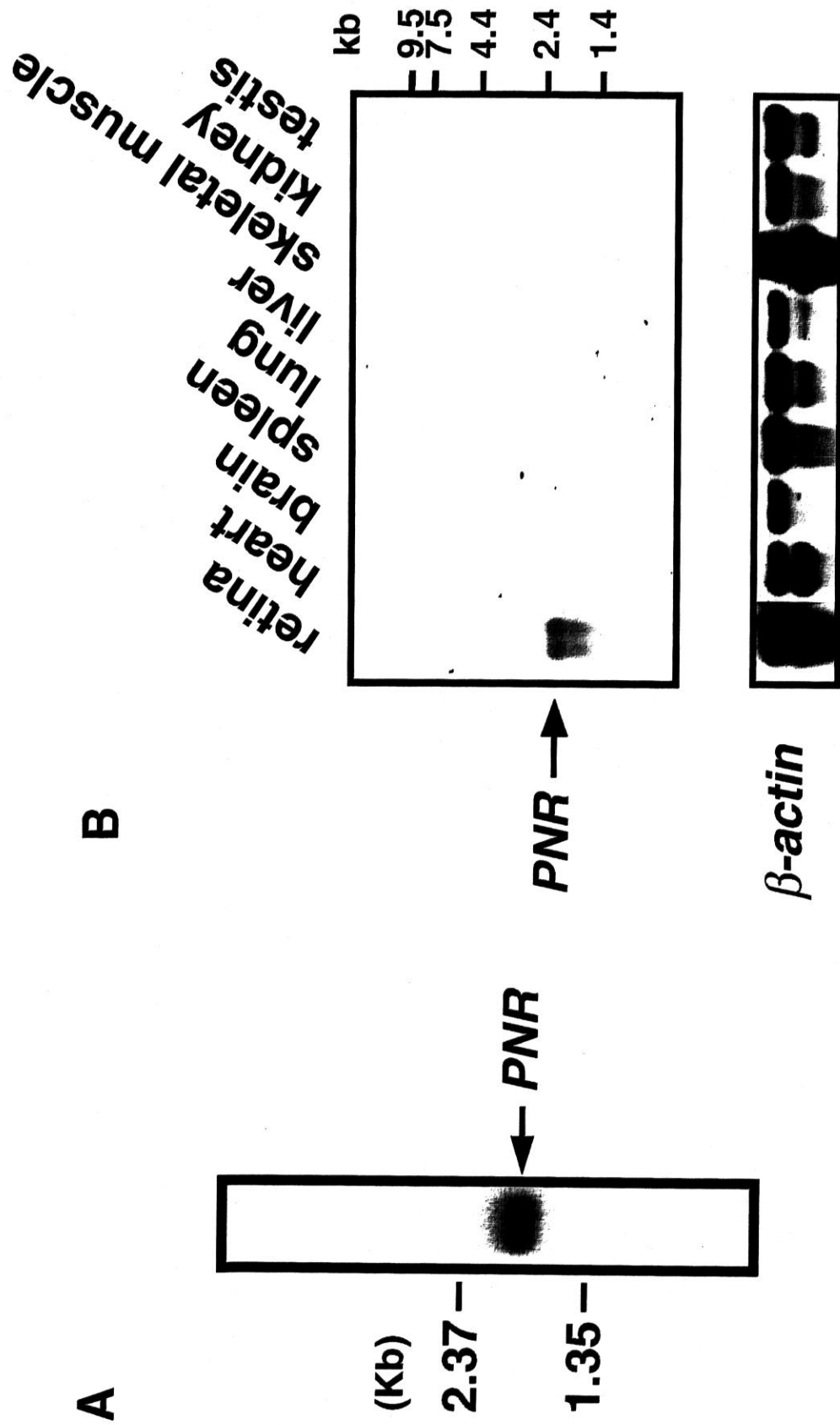


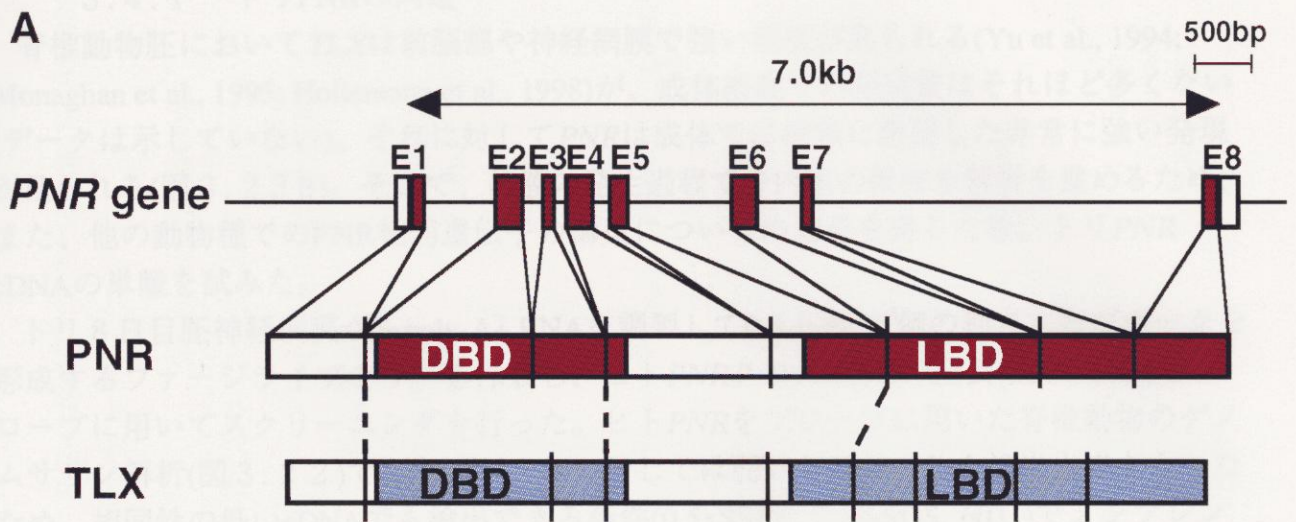
図 3.2.3 PNRの組織特異的発現

A) Y79細胞株での発現。0.6 μ gのpoly-A(+) RNAを泳動した。
 B) ラット成体各組織での発現。各レーン2 μ gのpoly-A(+) RNAを泳動した。β-actinのプロローブをRNA量のコントロールとして用いた。

3.3.5 ヒト *PNR* 遺伝子の解析

これまで遺伝性網膜疾患との連関がマップされている染色体領域は約100に上る (RetNet web site; <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>) が、その遺伝子産物が特定されている例は、ホメオボックス遺伝子の *CRX* 遺伝子 (Freund et al., 1997) など20数例である。そこで網膜に局限した発現をする *PNR* は、網膜疾患の原因遺伝子ともなる可能性が高いと考え、ヒト *PNR* 遺伝子を単離することにした。まず、マウス *TLX* の遺伝子構造との比較からイントロンの位置を予想し、ゲノムを鋳型としてPCRを行った場合に1kb以下の断片が増幅されるようにプライマー *KMO19* と *KMO20* を設計した (図 3.1 9)。まずヒトゲノムDNAを鋳型としてPCRを行い、特異的なバンドが増幅されることを確認した。次にこのプライマーセットを用いてGenome Systems社からインサート長約65kbのP1プラスミドクローンを1種類得た。以下は竹沢慎一郎君と共同で行った実験である。P1プラスミドを含む大腸菌からプラスミドDNAを回収し、各種制限酵素で処理した後、0.5% Seakem Gold agarose (FMC) で泳動し、ヒト *PNR* のcDNA (P1プラスミドのスクリーニングに用いたのと同じ領域) をプローブとしてサザンブロットを行った。XbaI で切断したレーンで8.5kbの位置にシグナルが検出できたので、この断片をサブクローニングして塩基配列を決定したところ、エクソン8を除くヒト *PNR* の全コード領域と約5kbのヒト *PNR* プロモーターと考えられる領域を含んでいることが分かった。そこで、エクソン8の構造に関してはP1プラスミドを鋳型に、*KT9* と *KMO39* をプライマーに用いて25サイクルのPCRを行い、増幅された断片をサブクローニングして塩基配列を決定した。その結果遺伝子のコード領域は約7kbに渡り、8つのエクソンにコードされていることがわかった (図 3.2 4 A)。イントロンの5'側、3'側末端はそれぞれGT、AGとなっており、スプライシングのコンセンサス配列 (Breathnach and Chambon, 1981) と一致した (図 3.2 4 B)。また遺伝子のコード領域の配列はY79から得られたcDNAの配列と完全に一致した。*PNR* と *TLX* のエクソン/イントロン構造 (Jackson et al., 1998) を比較すると、相同な位置にエクソン/イントロン境界が存在する場合も見られるが、両者が核内レセプターの中で特に類似した遺伝子構造を持つとは言えない。

次にこのP1クローンをプローブとして用い、谷脇雅史博士 (京都府立医大) との共同研究によってFISH法により染色体位置の決定を行ったところ20個の分裂期の細胞を観察し、20個全てで15q24という領域に特異的なシグナルが得られた (データは示していない)。15q24領域の中で染色体マーカー *D15S211* と *D15S152* に近傍の領域が、パキスタン人の一家系において精神遅滞を伴う遺伝性網膜疾患に連鎖すること (Mitchell et al., 1998) が報告されている。そこで *PNR* を含むP1プラスミド中に *D15S211* と *D15S152* 近傍の染色体マーカー (Gyapay et al., 1994) が存在するかどうかをPCR法によって検討したが、その存在は確認出来なかった。



B ヒト PNR 遺伝子におけるエクソン/イントロンの境界配列

Exon No.	Intron No.	Exon No.
5' donor	(Size <bp>)	3' acceptor
1	TCCCACAG/gtatggcttc.....A....gccctcag/GCGTGAG P T G ₄₀ (650) V S	2
2	ATCTACAG/gtgagtgcgg.....B....cacctgcag/GTGCCAG I Y R ₈₂ (156) C Q	3
3	CCAGGACG/gtgaggcggg.....C....cctccccag/CCGTGCA Q D A ₁₁₇ (85) V Q	4
4	AGAGGATG/gtgagtggga.....D....ctccaacag/CTGATGA E D A ₁₉₁ (159) D E	5
5	GGGATCAG/gtacctaccg.....E....tgagcacag/GTGATCC D Q ₂₄₉ (~900) V I L	6
6	CAAGCCAG/gtaactgagt.....F....tctccccag/AGACGCG K P E ₃₃₂ (380) T R	7
7	CCCGTGAG/gtgacctgag.....G....cctgttcag/GTTTGGG P V R ₃₆₇ (~3400) F G	8
8	AAACTAGTGG..... N *	

図 3.24 ヒト PNR の遺伝子構造

ヒト PNR コード領域は 8 つのエクソンから構成されている。PNR、TLX 間で
 相同な位置にエクソン/イントロン境界が存在する場合、両者を破線で結ん
 で示した。PNR と TLX は遺伝子構造から見ると、核内レセプターの中で特
 に類似しているとは言えない。

3.4 トリ・マウスPNRの同定と発現解析

3.4.1 トリPNRの同定

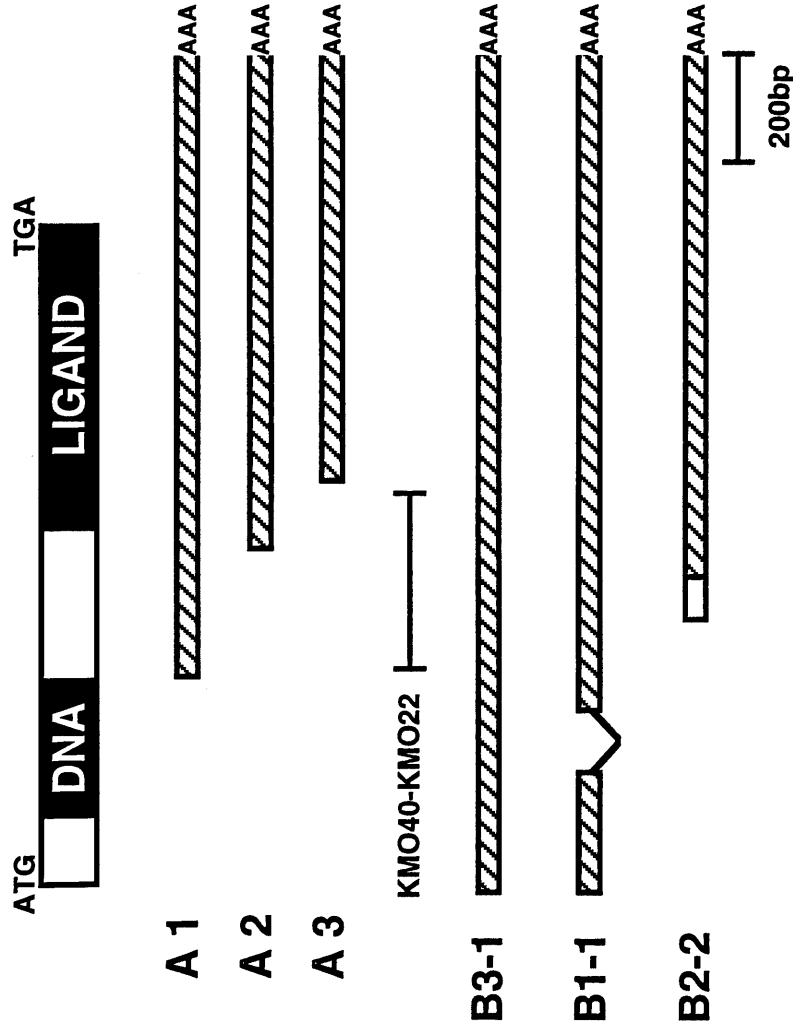
脊椎動物胚においてTLXは前脳部や神経網膜で強い発現が見られる(Yu et al., 1994; Monaghan et al., 1995; Hollemann et al., 1998)が、成体網膜での発現量はそれほど多くない(データは示していない)。それに対してPNRは成体では網膜に限局した非常に強い発現が見られる(図3.23B)。そこで、網膜の発生過程でのPNRの機能を解析を進めるため、また、他の動物種でのPNR相同遺伝子の構造についての知見を得るため、トリPNR cDNAの単離を試みた。

トリ8日目胚神経網膜からpoly-A+ RNAを調製して $0.4-0.8 \times 10^5$ 個の独立したプラークを形成するファージライブラリーを作製し、ヒトPNRクローンM2の全長(図3.18)をプローブに用いてスクリーニングを行った。ヒトPNRをプローブに用いた脊椎動物のゲノムサザン解析(図3.22)で、トリゲノムに対しては弱いシグナルしか検出出来なかったため、相同性の低いcDNAでも検出できる条件(0.5xSSPE, 0.1%SDS, 60°C)でメンブレンの洗浄を行った。1次スクリーニングで27個、2次スクリーニングではそのうち15個の陽性クローンを選択してプラスミドとしてDNAを回収し、ベクターの両側から塩基配列を決定した。その結果、既知の核内レセプターとしてはTLXが3クローン、COUP-TF1が2クローン、EAR2(COUPのサブタイプ)が1クローン得られ、ヒトPNRに類似した新規核内レセプターは3クローン(A1、A2、A3)が得られた(図3.25, 3.26)。この3クローンは重なる領域の塩基配列が互いに相同であった。しかしこれらのクローンはいずれもDBDに相当する領域から上流側の塩基配列を欠いていた(図3.25, 3.26)。またヒトPNRではこの付近はGC含量が高いことから、2回目にライブラリーを作成するにあたって、逆転写酵素の反応温度を段階的に上げ、また時間を長くして、 2.0×10^5 個の独立したプラークを形成するファージライブラリーを作製した。トリPNRの5'端を含むクローンを得るため、プローブにはトリcDNAクローンA1の最も5'端の部分(図3.25)を用い、厳しい条件(0.2xSSPE, 0.1%SDS, 60°C)でメンブレンの洗浄を行った。1次スクリーニングで9個、2次スクリーニングではそのうち3個の陽性クローンを選択してプラスミドとしてDNAを回収し、ベクターの両側から塩基配列を決定した。その結果、クローン(B1-1、B2-2、B3-1)が得られた(図3.25)。クローンB3-1とB1-1の5'端は完全に同じであるが、B1-1ではB3-1の225塩基対から328塩基対までの領域が欠失していた(図3.25, 3.26)。これは丁度ヒトPNRのエクソン3に相当する領域にあたり、B1-1はミスプライミングによる転写産物であると判断した。またクローンB2-2はB3-1の583塩基対から下流の塩基配列とのみ相同性を示した(図3.25, 3.26)。相同性が見られなくなる境界は丁度ヒトPNRのイントロンDが存在する位置にあたり、B2-2はミスプライミングによるものか、あるいは他のクローンとは異なるエキソンを持つ転写産物であると考えられる。

3.4.2 トリPNRの構造

以上の結果得られた最大のクローンB3-1は全長約1.7kbで3'端にpoly A配列を含み、poly A付加シグナル配列の他、1218bpからなるORFを持つ(図3.26)。このORFから予

1 回目 0.4-0.8x10⁵ independent plaques



1 次スクリーニング ↓

27 positive clones

2 次スクリーニング ↓

15 positive clones

塩基配列決定 ↓

PNR ? 3 clones
TLX 3 clones
COUP-TF1 2 clones
EAR-2 1 clone

2 回目 2.0x10⁵ independent plaques

1 次スクリーニング ↓

9 positive clones

2 次スクリーニング ↓

3 positive clones

塩基配列決定 ↓

PNR ? 3 clones

図 3.2.5 トリ PNR cDNA の単離

ヒト PNR クローン M2 をプロベープにトリ 8 日胚神経網膜ライブラリーよりトリ PNR cDNA のスクリーニングを行った。DNA; DNA 結合領域, LIGAND; リガンド結合領域。2 回目のスクリーニングに用いたプロベープ (KMO40-KMO22) の位置、クローン B1-1 で見られたエクソンの欠失部分も合わせて示した。クローン B2-2 の白抜き部分は他のトリ PNR クローンと相同性が見られない領域を示している。また、右側にスクリーニングの流れを示した。

```

acggtccgCGGGGACAGCCAGCATGGCTGCGTCGCGGGGGTGGTGGTGGAGCGGGCTAGAGGACAGCCCTCGGGACTGAGC 81
M A A S P A G S V V S A G L E D S P S G L S 22

CCAGCCCTGGCAAGGCACTGAGCCCCGACTGCTGTGCAAGGTGTGCGGGGACACCAGCAGTGGGAAGCACTACGGCATCTATGCCTGC 171
P A P G K A L S P V L L C K V C G D T S S G K H Y G I Y A C 52
      ↓
AATGGCTGCAGTGGCTTCTTCAAGCGCAGCGTCCGAGGAAGCTCATCTACAGTGTCCAGGCAGGGACGGGGCTGTGCCAGTGGACAAG 261
N G C S G F F K R S V R R K L I Y R C Q A G T G L C P V D K 82
      ↓
GCACACGCAACCAGTGGCAGGCATGCCGGCTCAAGAAGTGCCTGCAAGCCGGCATGAACAAGGATCTGTGCAGAACGAGCGCCAGCCC 351
A H R N O C Q A C R L K K C L Q A G M N K D A V Q N E R Q P 112
      ↓
CGGAGCACAGCCAGTTCGGCTAGACAGCATGAGCTGGAGCCGAGCTGCCCTGAGCACGTGGCTGCCACGGTGTATGTCCCCCG 441
R S T A Q V R L D S I E L D A E L P P E H V A A T R D V P P 142
      ↓
GTTCCCTGCCCGCCCGCTGGCCATGGGGTACTGCTGCCACCGCTGCCCTGCCCGCACGCCACACCACCAACCACCGCTTC 531
V P C P A P R G H G A T A A T A A V P R T P T P P T N H R F 172
      ↓
ATGGCCAGCCTGATGACCGCCGAGACCTGCCGCAAGCTGGAGCCCGAAGAGTGTGATGAGACAGTGGATGTGACGGGTGTGAGCCCGAG 621
M A S L M T A E T C A K L E P E D V D E T V D V T G G E P E 202
      ↓
CGGGCGGGCGTGAATACCGGTGCCCGCTACCCAGCAGCTGGTCCGAAACGCTCTACGAGACCTCAGCACGCCCTTCTTTCATGGCT 711
R A G G E Y Q V A P Y P A A G P E N V Y E T S A R L L F M A 232
      ↓
GTCAAGTGGGCAAAGAACCCTGCCTGTCTTCTCCAATCTGCCCTTCCGGGACCAGGTGATCCTGTGGAGGAGCGTGGAGCGAGCTGTTC 801
V K W A K N L P V F S N L P F R D Q V I L L E E A W S E L F 262
      ↓
KMO23-KMO24
CTGCTCTGTGCATCCAGTTCATGCCCTGGAGAGCTGCCCGTGTGGCGTCCCGAGCCATCCCTGGCAAGCTGTGCCAGCC 891
L L C A I Q W S M P L E S C P L L A V P E P S P G K L L P A 292
      ↓
GCCGTGGACGTGCGGGCGCTGCAGGAGACCCTGGGGCGCTTCAAGGCATTTGGCTGTGATCCACCGAATTTGCCCTGCATGAAGGCTGTG 981
A V D V R A L Q E T L G R F K A L A V D P T E F A C M K A V 322
      ↓
GTGCTCTTCAAGCCAGAGACTCGGGCTGAAGGACCCCGAGCAGTGGAGAACCTGCAGGACCAGTCCAGGTGATGCTGGGCCAGCAC 1071
V L F K P E T R G L K D P E Q V E N L Q D Q S Q V M L G Q H 352
      ↓
AACCGCTCCCACTACCCCGGCGAGCCCGTCAAGTGTGGGAAGCTGCTGCTGCTTCTGCCAGCCCTGGCTTCTCTCTCCGAGCGGCTC 1161
N R S H Y P G Q P V R F G K L L L L P A L R F L S S E R V 382
      ↓
GAGCTGCTCTTCTCCGCGTACCATTTGGCAACCCCATGGAGAAGCTGCTCTGCGGACATGTTCAAGAACTGACCCCTCCCGCTGT 1251
E L L F F R R T I G N T P M E K L L C D M F K N * 406
      ↓
CACCTGGCTGCTGCTCGGTGGCTTTTGGGATACCCGCACTGTTTGTCCCGTGTGCTGGCACTCTGTACCCCTGCTCTCCTTGGGGC 1341
GTGGATGTCCCGAGGCGAGCAGCAAGTCCCTGGGGTGTCCCAAGTGGTGCAGGAGGGTGGGTGGCAGGGGACATCTCCAGGTGGCA 1431
CCGAGAGGACCAGGGTGGCACCTCAATGGGTGCCACTGTCCCAACCAACCTGAGCATCCCTGACACGGTGGCAGCAGCAGCCCAAC 1521
GCAGGGACACGACACCAGCTGGGGTGGCACTGGGGGGGACCTGTGGGGACAGAGCTGTGTTCTCCCATCCAGGGTGGCAGCCAGC 1611
CCCCCTATTTTGTACTCCAATAAAGAGGGCTTTTGCAGACAAAAAATAAATAA 1666

```

図 3.26 トリPNR cDNAの全塩基配列と予想されるアミノ酸配列

クローニングの過程で使用したベクターに由来する配列は小文字で、DNA結合領域、リガンド結合領域をそれぞれ黒矢印、白矢印で囲って、ポリA付加シグナル配列を下線で、クローンA1、A2、A3の最も5'端の塩基を*で、ノザンプロットのプローブとして用いた領域を影を付けて、それぞれ示した。また、クローンB1-1、B2-2が得られたことから予想されるイントロンB-Dの位置を示した。

想されるタンパク質は406アミノ酸からなり、大きさは約44.2kDと考えられる(図3.26)。また、核内レセプターに特徴的なDBD、LBD様の構造を持ち、それらの領域はヒトPNRとそれぞれ89%、80%の相同性を示した(図3.27, 3.28)。また、ヒトPNRで新たな特徴として指摘したP box中のアスパラギン残基(N)はトリにおいても保存されていた。しかし種間での保存度が極めて高いTLXと比べると、全体としては相同性は低く(図3.28)、ヒトPNRをプローブに用いた脊椎動物のゲノムサザン解析(図3.22)での結果を裏付けるものとなった。

最近ゲノムの全塩基配列が決定された線虫にもPNR(F56E3.4; GenBank U41536)、TLX(C08F8.8又はNHR-67; EMBL Z73103)それぞれに対応すると考えられる特徴的なP boxの構造を持つ転写単位が報告されている(図3.28)。またPNRのP box、D box、T/A boxの構造はヒト・トリ・ハエ(梅園良彦; 私信)間で高度に保存されており(図3.29)、特に保存されるべき必要性があったと考えられる。一方LBDの構造は大きく異なっているが、3.4.1の結果はヒト・トリ間でPNRのイントロン・エキソン境界が保存されていることを示している。

3.4.3 トリPNRの発現解析

次に、トリ8日目胚、14日目胚各組織で全RNAを用いたノザンブロットを行ってTLXとPNRの発現パターンを解析した。TLX cDNAをプローブとして用いた場合は前脳・中脳・神経網膜・色素網膜で約3.2kbの特異的なシグナルが検出できるのに対して、PNR cDNAをプローブとして用いた場合は神経網膜のみで特異的なシグナルが認められ、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(図3.30; 14日目のデータは示していない)。またPNRのmRNAとしてはスクリーニングで得られたクローンB3-1の大きさと一致する約1.7kbの強いシグナルの他に約2.6kbの弱いシグナルが検出できた。プローブとして、DBDとLBDの間の領域(KMO6-KMO22)あるいはLBD(KMO23-KMO24)(図3.26)のいずれを用いた場合でもこの2種類のシグナルが検出できることから、これらは確かにPNRのコード領域に特異的なシグナルであると判断できる。

このようにPNRの発現はトリ胚においても網膜に特異的であることが分かってきたが、次に14日目胚神経網膜の切片を用いて、神経網膜の中でのさらに細かい発現分布を解析することにした。トリ14日目胚で網膜は、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。そこで、京都大学ウイルス研究所の原健二博士と共同で14日目胚から眼の切片を準備し、*in situ*ハイブリダイゼーション法によって神経網膜での発現分布を解析した。その結果、PNRの発現は視細胞層でのみ認められた(図3.31)。マウス初期胚でTLXは網膜の神経節細胞層で強く発現することが知られている(Monaghan et al., 1995)が、トリ14日目胚ではTLXの発現は検出出来なかった(データは示していない)。

次にPNRのトリ胚における発現時期を解析した。まず、3日目胚において、胚全体から抽出したRNAを用いてRT-PCR法を行うとともに、胚全体における発現を*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて検討したが、いずれの場合もPNRに特異的なシグナルを検出出来なかった。そこで、4日目から18日目胚までの神経網膜よりRNAを抽出し、全

PNR



TLX

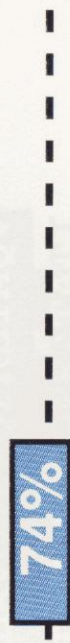
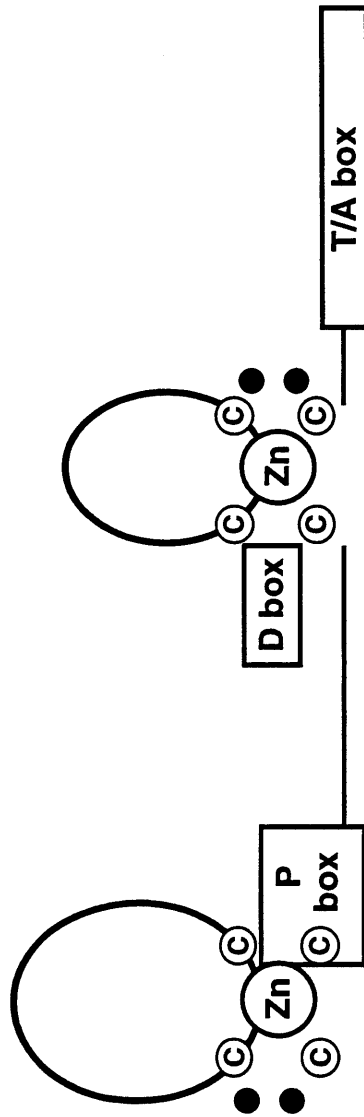


図3.28 進化的に保存度の高いTLXに比べて、PNRの構造は種差が大きい。
ヒトTLXはヒトPNRと、トリ・線虫はヒト相同タンパク質と比較し、数字で示した。

Finger 1

Finger 2



	P box	D box	T/A box
hPNR	CNGCSGFF	CQVGAGM-C	NQDAVQNERQPRSTAQV
cPNR	CNGCSGFF	CQAGTGL-C	NKDAVQNERQPRSTAQV
dPNR	CNGCSGFF	CQAGTGR-C	NKDAVQNERQPRNTATI
<i>C. elegans</i>	CNGCSGFF	CQAGTGN-C	NKDAVQNERQPRNTATI
hTLX	CDGCSGFF	CKSGNQGGC	NKDAVQHERGPR-TSTI

図 3.2 9 PNRのDNA結合領域

PNR DNA結合領域の一次構造はTLXに類似するが、P box, D boxが異なる。
PNRに特徴的なP boxの構造は、進化の過程で完全に保存されている。

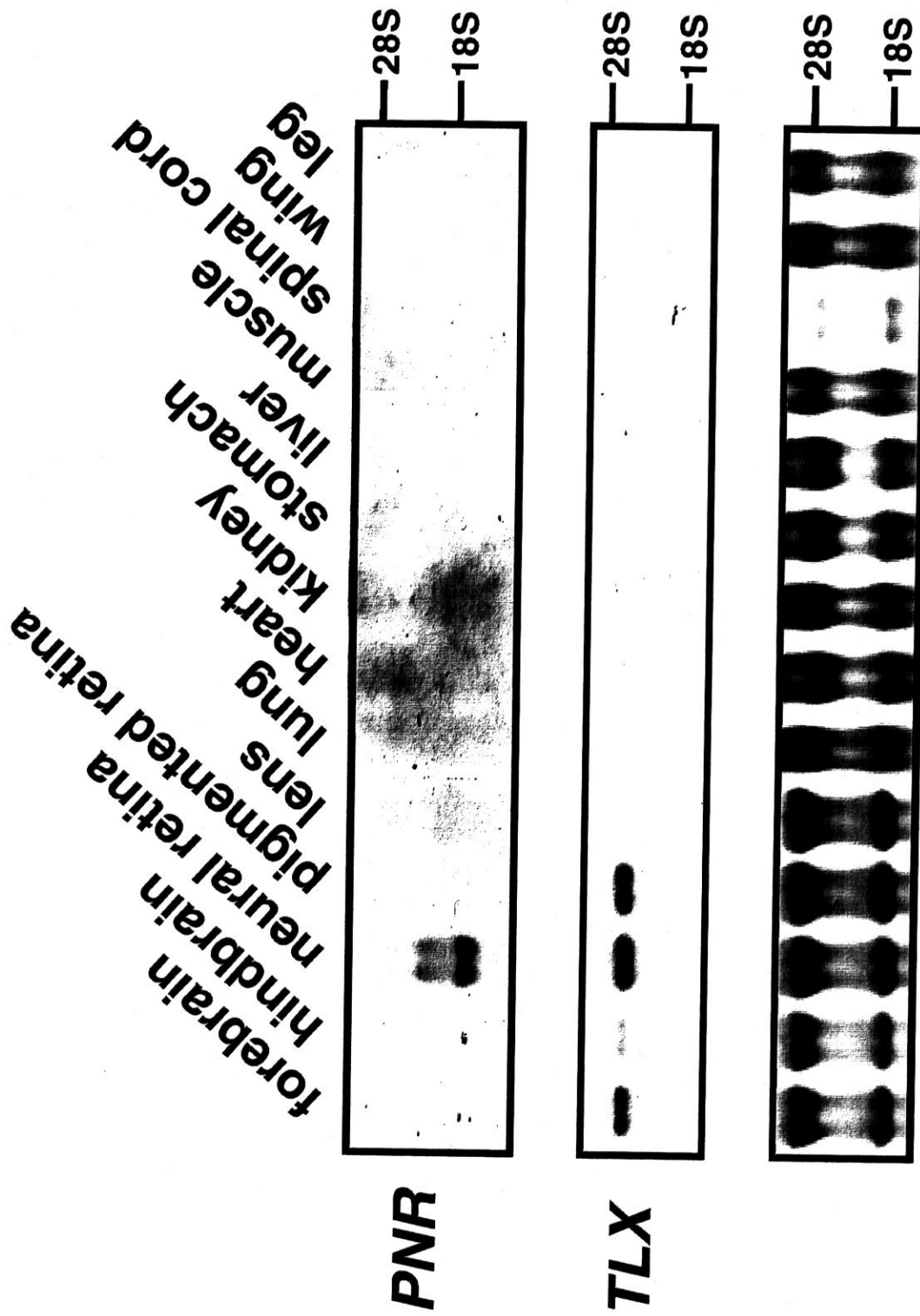


図 3.30 トリPNR の組織特異的な発現

トリ8日目胚各組織での発現をノザンブロットで解析した。PNRの発現は神経網膜に特異的である。1レーンあたり10 μ gの全RNAを泳動した。

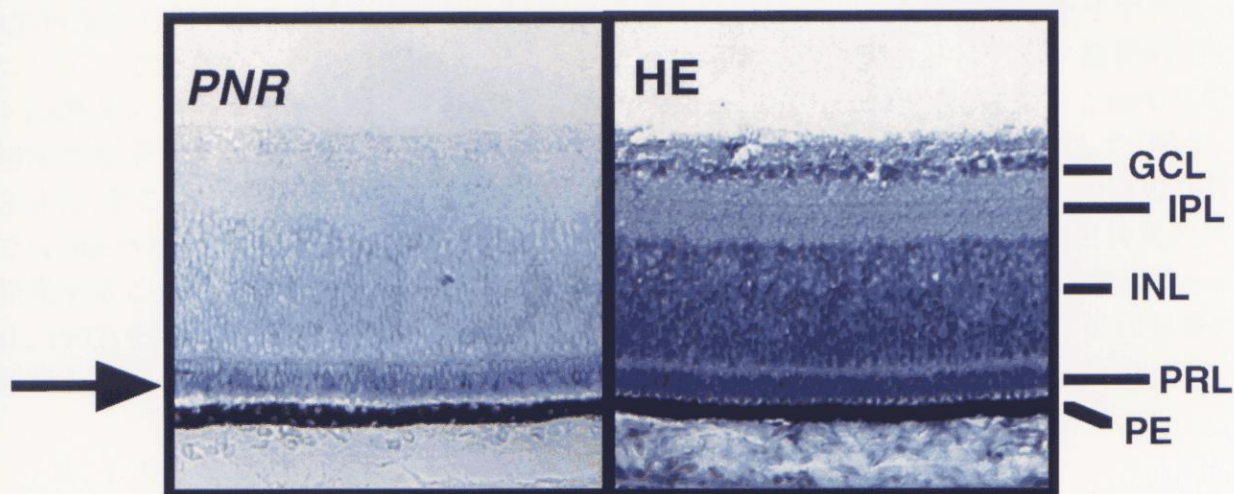


図 3.3 1 *PNR*のトリ胚視細胞層に局限した発現

左が*PNR*プローブを用いた*in situ*ハイブリダイゼーション、右がヘマトキシリン-エオシンによる組織染色。*PNR*のトリ14日目胚網膜における発現は視細胞層(*PRL*)に特異的である。GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; *PRL*, photoreceptor layer; PE, pigment epithelium.

RNAを用いたノザンプロット法を用いて解析を行った(図3.32)。その結果、*TLX*は4日目には既に強い発現が見られ、8日目以後徐々に発現量が低下していくのに対し、*PNR*は視細胞が分化し始める5日目以降(Hoover et al., 1998)、徐々に発現が見られるようになることが判明した。また、*PNR*特異的なシグナルは前述のように常に2本見られ、約2.6kbのシグナルは11日目から16日目の間で特に強い発現が見られた。

このようにトリ*PNR*が視細胞の分化・機能維持に関与する可能性が示唆されたため、視細胞特異的な転写因子の解析が進んでいるマウスの系を用いて*PNR*の機能解析を進めることを考え、次にマウス*PNR* cDNA断片の単離を試みた。

3.4.5 マウス*PNR*の同定と発現解析

まずヒト*PNR* cDNAの塩基配列に基づいてプライマーKMO47とKMO49を設計した。これまでの解析から*PNR*の発現は発生初期よりもむしろ成体において強いことが示されたため、マウス成体(3ヶ月)の眼からRNAを抽出し、上記プライマーセットを用いてRT-PCRを行い、約760bpの特異的な断片の増幅に成功した。この増幅断片をサブクローニングして塩基配列を決定したところ、その塩基配列から予想されるアミノ酸配列がヒト*PNR*タンパク質と86%の高い相同性を示した(図3.33)。またDBDに限ると98%もの相同性を示したことから、この断片をマウス*PNR* cDNAの一部であると判断した(図3.33)。そこでこの配列をプローブとして用い、原博士と共同で2週齢マウスの眼の切片で*in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析を行った。この時、視細胞特異的に発現することが知られているホメオボックス遺伝子の*CRX*(Furukawa et al., 1997; Chen et al., 1997)をコントロールとして用いた。その結果マウスでも、*PNR*の発現は視細胞層に限局し、*CRX*と局在が一致することが判明した(図3.34)。

3.4.6 ヒト細胞株における*PNR*と*CRX*の発現特異性

これまでの結果から、ヒト網膜芽腫細胞株Y79から単離された新たな核内レセプター*PNR*は、ESTデータベース中では網膜由来のライブラリーからのみ見出され、ノザンプロット法を用いた成体ラットにおける発現解析の結果、その発現は網膜に限局していることが判明した。ニワトリ胚におけるノザンプロット解析から*PNR*の発現は発生途上においても神経網膜に限局しており、ニワトリ・マウスについて行った網膜切片での*in situ* ハイブリダイゼーション法による解析の結果、*PNR*は神経網膜の中でもただ一種類の細胞層、視細胞層でのみ発現が見られるというユニークな特徴を持つことが明らかになった。

細胞株であるY79株は基本的に一種類の細胞クローンから構成されていると考えられるが、以上の結果を考え合わせると、網膜の中でも視細胞としての性格を保持していることが予想される。そこで視細胞特異的に発現する転写因子の*CRX*や、やはり視細胞で発現することが知られているbZIP型転写因子*NRL*(Swaroop et al., 1992)と*PNR*の発現特異性が一致するかどうかを、8種の細胞株でRT-PCR法を用いて検討した。その結果、Y79細胞株では*PNR*、*CRX*、*NRL*いずれも発現が見られたが、他の細胞株では見られなかった。この結果はY79細胞株が視細胞特異的な性格を保持していることを示唆し、*PNR*の機能を解析していく上で、よいモデル系になると考えられる(図3.35)。

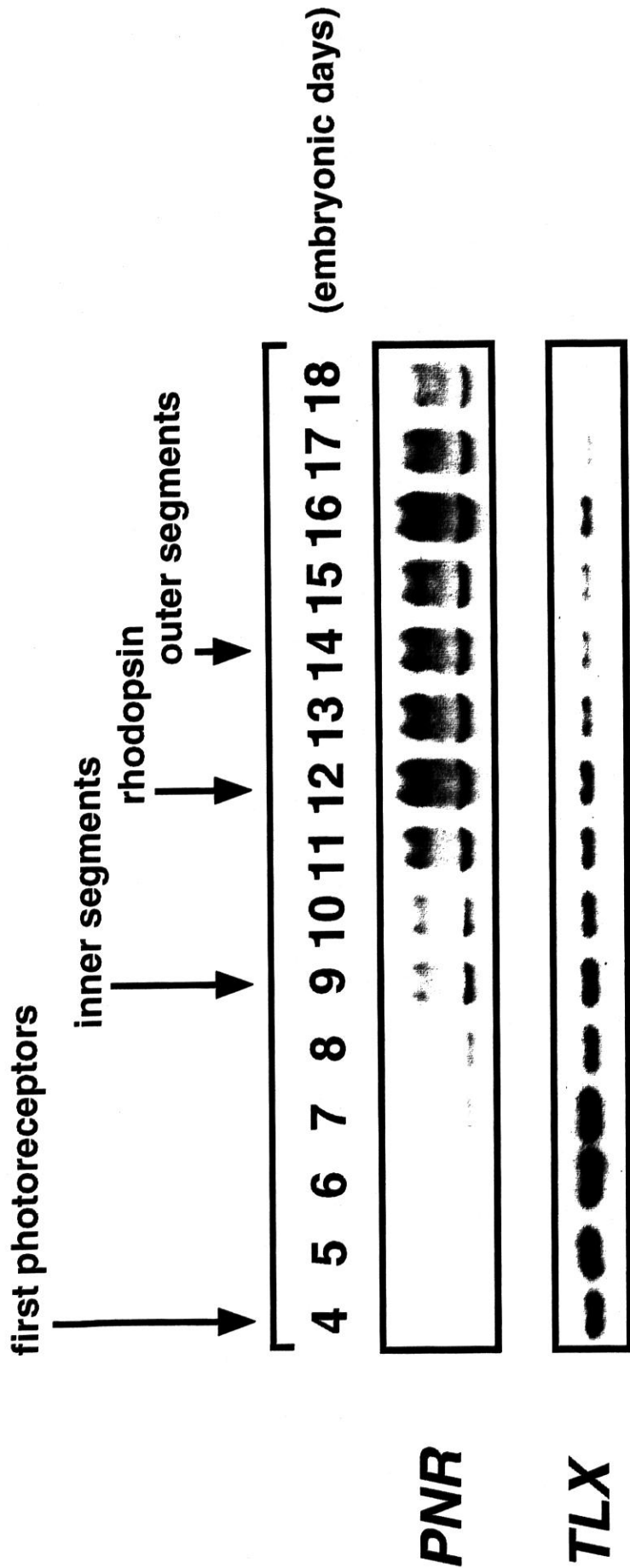


図 3.3.2 トリ初期発生におけるPNR、TLXの発現

神経網膜でのトリPNRの発現は胚性5日目からわずかに見られるようになり、徐々に強くなっていった後、11日目以降は一定レベルに達する。それに対してTLXは4日目ですでに強い発現が見られ、8日目以降徐々に弱くなっていく。1レーンあたり10 μ gの全RNAを泳動した。網膜特異的なマーカー、構造が最初に現れる時期(Hoover et al., 1998)を上を示した。

hPNR	METRPTALMSSTVAAAAAPAAGAASRKESPGRWGLGEDPTGVSPSLQ	46
	DNA binding domain	
hPNR	CRVCGDSSSGKHYGIYACNGCSGFFKRSVRRRLIYRCQVGAGMCPVDKAH	96
mPNR	IYACNGCSGFFKRSVRRRLIYRCQVGAGMCPVDKAH	
	RNQCQACRLKKCLOAGMNODAVONERQPRSTAQVHLDSMESNTESRPESL	146
	RNQCQACRLKKCLOAGMNODAVONERQPRSMQVHLDAMETGSDPRSEPV	
	VAPPAPAGRSPRGPTPMSAARALGHFMASLITAETCAKLEPEDADENID	196
	VASPALAGPSPRGPTSVSATRAMGHFMASLITAETCAKLEPEDAENID	
	Ligand binding domain	
	VTSNDPEFPSSPYSSSSPCGLDSIHETSARLLEFMAVKWAKNLPVFSNLPF	246
	VTSNDPEFPASPCS-----LDGIHETSARLLEFMAVKWAKNLPVFSNLPF	
	RDQVILLEEAWSEFLLGAIQWSLPLDSCPLLAPPEASAAGGAQGRLTLA	296
	RDQVILLEEAWNELFLLGAIQWSLPLDSCPLLAPPEAS--GSSQGRLLA	
	SMETRVLQETISRFRALAVDPTEFACMKALVLFKPETRGLKDPEHVEALQ	346
	SAETRVLQETISRFRALAVDPTEFACM	
	DQSQVMLSQHSKAHHPSPVRFGLLLLLPSLRFITAERIELLEFRKTIG	396
	NTPMEKLLCDMFKN	410

図 3.3 3 ヒト・マウスPNRタンパク質の構造比較

DNA結合領域、リガンド結合領域をそれぞれ影を付けて、ヒト・マウス間で相同なアミノ酸残基は線で結んで、マウス配列のうちクローニングに用いたプライマーに由来する領域を太字で、それぞれ示した。

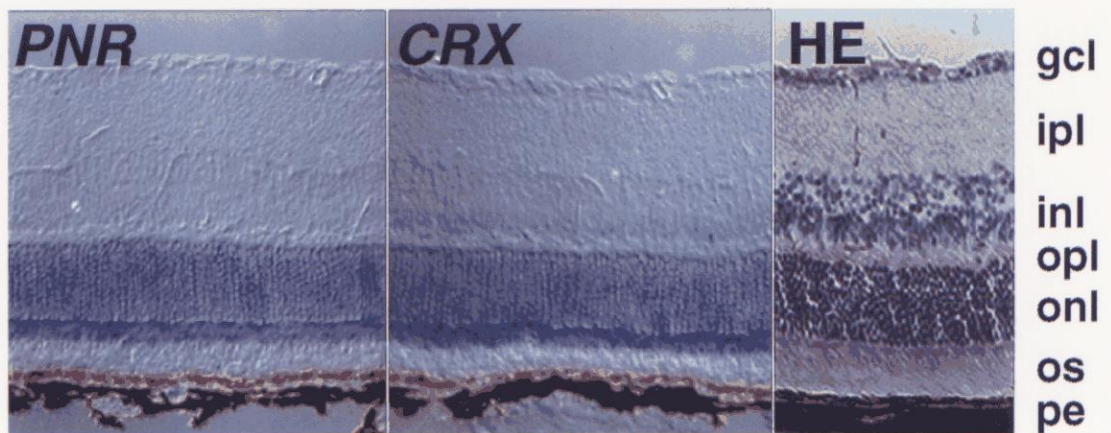


図 3.3 4 *PNR*のマウス網膜視細胞層における発現

マウスにおいても *PNR* の発現は視細胞層特異的である。*PNR*、*CRX* はそれぞれに特異的なプローブを用いて解析したもの、*HE* はヘマトキシリン-エオシンによる組織染色。gcl, ganglion cell layer; ipl, inner plexiform layer; inl, inner nuclear layer; opl, outer plexiform layer; onl, outer nuclear layer; os, outer segments; pe, pigment epithelium.

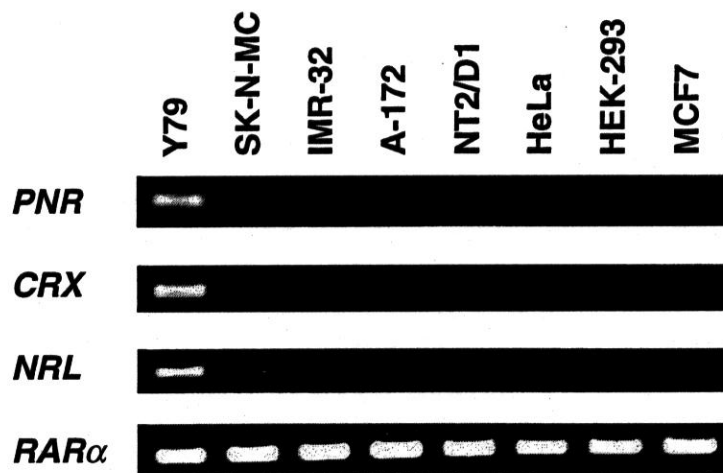


図 3.3 5 ヒト細胞株における *PNR*、*CRX*、*NRL* の発現特異性

上に示した各細胞株から全RNAを抽出し、左に示した転写因子に特異的なプライマーを用いてRT-PCR法で発現を解析した。ヒト細胞株においても *PNR* と *CRX* それに *NRL* の発現特異性は一致する。

3.5 PNRの標的配列特異性

3.5.1 PNR標的配列の同定

現在知られている核内レセプターはP boxの構造によって、糖質コルチコイドレセプター (GR)に代表されるタイプ1と、RARに代表されるタイプ2とに大きく分けることが出来る(図3.17, 3.36A)。また、タイプ1あるいはタイプ2のP boxを持つ核内レセプターの標的配列基本モチーフはそれぞれAGAACAあるいはAGGTCAであることが知られている(図3.36A)。TLXではP box中で4番目のリジン残基(K)がセリン残基(S)に置き換わっており、AAGTCAを特異的に認識する(図3.36A)。PNRではTLX型のP boxからさらに1番目のアスパラギン酸残基(D)がアスパラギン残基(N)に置き換わった構造を持つ。そこで、このP boxアミノ酸残基の置換がPNRとTLXの標的配列特異性の差を反映しているかどうかをゲルシフト法を用いたタンパク質/DNA結合アッセイで検討した。

まず、PNRタンパク質の同定が簡便に行えるよう、N末端側にHA-タグを融合させたヒトPNRタンパク質を発現するプラスミドを作製した。このプラスミドをCOS-1細胞内で強制発現させて細胞抽出液中にPNRタンパク質が合成されていることを、HA抗体を用いたウエスタンブロット法により確認した(データは示していない)。

TLXが*krüppel*配列に結合することは本研究でも確認した(図3.6)が、今回COS-1細胞を用いて調製したTLXも*krüppel*配列に結合することを確認した(図3.36B; lane 1)。しかし、この配列に対するPNRの結合は認められなかった(図3.36B; lane 2)。この観察からPNRはP box中で1番目のアミノ酸がアスパラギン残基(N)となっているせいで、TLXとは異なる標的配列特性を発揮していることが予想された。核内レセプター群の標的配列とその結合機構に関するこれまでの解析から、P box中で1番目と4番目のアミノ酸残基が置換された場合、6塩基対からなる標的配列基本モチーフのうち2から4番目の塩基に対する特異性が変化することが示唆されている(図3.36A)。そこで*krüppel*配列中に存在するAAGTCAモチーフのうち2から4番目の塩基をランダムに置き換えたプローブ(Kr-rdm)を作製し、TLX、PNRそれぞれのタンパク質の結合活性を検討した。その結果、TLXの結合したバンドは確認できた(図3.36B; lane 4)が、PNRの結合したバンドは確認できなかった(図3.36B; lane 5)。

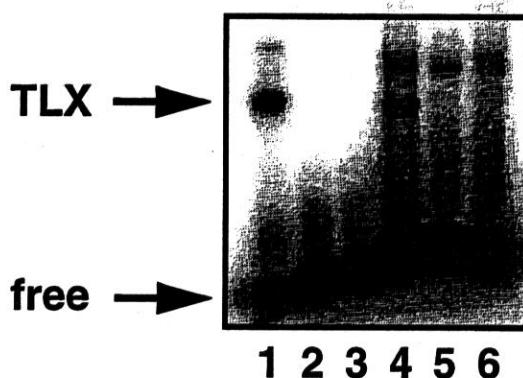
その理由として、1) PNRはさらに大きく異なる標的特異性を持つ、2) PNRは単量体ではDNAに結合できず、二量体を組んで初めて結合できる、の2つの可能性を考えた。PNRタンパク質のDBDはTLXタンパク質に最も類似しているが、構造上近縁な核内レセプター群としては、図3.21の系統樹で見たように、RXRやCOUP、HNF4などホモ二量体を形成して標的配列に結合するものが多く、このグループの中であって、単量体で標的配列に結合し得るTLXタンパク質はむしろ例外であるとも考えられる。また、このグループの核内レセプターは標的配列基本モチーフが間に1塩基対をはさんで反復した、いわゆるDR-1タイプの標的配列に結合することが知られている(梅園, 1996)。そこで上述の2つの可能性のうち、まず2) について再度検討することにした。

ショウジョウバエの*knirps*遺伝子上流に同定されているTLL/TLXの結合サイト(Pankratz et al., 1992)は*krüppel*配列同様1コピーのAAGTCAモチーフを含む(図3.37; Kni x1)。そこでこのAAGTCAモチーフが間に1塩基をはさんで反復した配列(Kni x2)を

A

レセプター	P box 結合基本モチーフ
Type I (GR, AR)	<pre> G S C K V \ AGAACA </pre>
Type II (RAR, TR)	<pre> E G C K G \ / AGGTCA </pre>
TLX	<pre> D G C S G \ / AAGTCA </pre>
PNR	<pre> N G C S G \ / A???CA </pre>

B



Kruppel (agctTCGGCAATTAAG **AAGTCA** AATTTCTagct)
 Kr-rdm (cgcggatcctgcagctcgagAATTAAG **ANNNCA** AATTTCTgtcgaacagcttctagagca)

図 3.3 6 PNRのDNA結合特異性

A) 核内レセプター群の標的配列とその結合機構に関するこれまでの解析から、PNRの標的配列の予想が可能である。特異的に認識される塩基と、その特異性を決定すると考えられているP boxアミノ酸残基とを実線で結んだ。

B) 発現ベクターのみ(lane 3, 6)、PNR (lane 2, 5) あるいはTLX (lane 1, 4)を *in vitro*で合成し、Kruppelプローブ(lane 1-3)、Kr-rdmプローブ(lane 4-6)に対するゲルシフトを行った。TLXに特異的な結合(→)は確認できた (lane 1, 4)が、PNRに特異的な結合は認められなかった (lane 2, 5)。

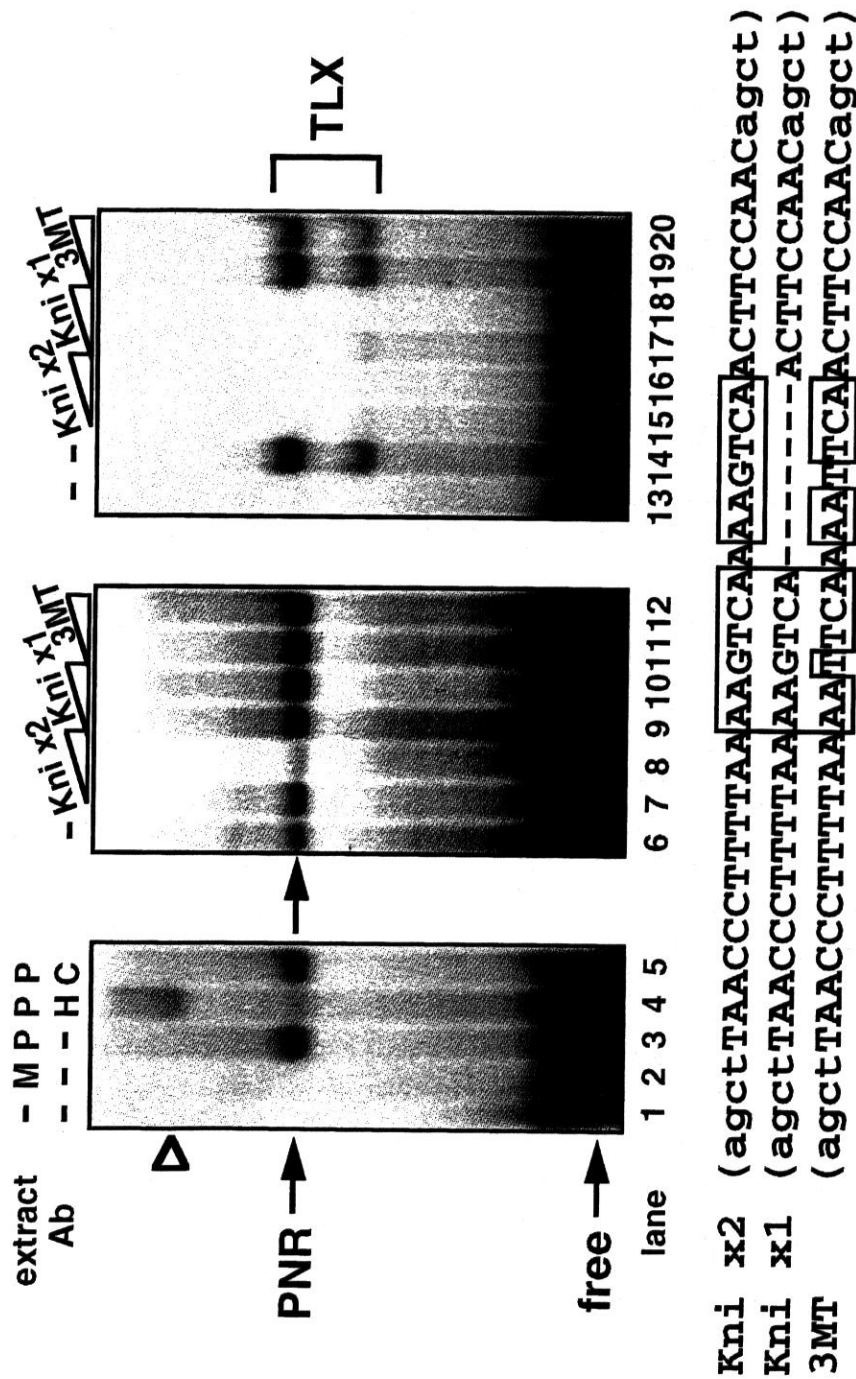


図 3.3.7 PNR の DNA 結合特異性

発現ベクターのみ(M)、あるいは、HA-エピトープを融合したPNR(P)をCOS細胞で強制発現させ、その抽出液を用いてKni x2プロローブに対するゲルシフトを行った。PNRに特異的な結合(→)はHA抗体(lane 4, H)ではsupershift (白三角)するが、対照抗体(lane 5, C)ではシフトしない。
lane 7-20は標識したKni x2プロローブに対する競合実験である。lane 7-12, 15-20は非標識のKni x2, Kni x1, 3MTをそれぞれ10倍、50倍量過剰に加えた。lane 6-12はPNR抽出液、lane 13-20はTLX抽出液を用いた。TLXはIコピートのAAGTCA配列に単量体で結合できるがPNRの結合にはAAGTCA配列が2コピー必要である。PNR, TLXの泳動度の違いから、PNRはホモ二量体を形成してDNAに結合すると考えられる。

作製し、これをプローブとして用いてPNRタンパク質の結合活性を検討した(図3.37)。プローブのみ(lane 1)、あるいはHA-タグのベクターを強制発現させたCOS-1細胞の抽出液とプローブを反応させた(lane 2)場合は見られなかったシグナルが、PNRを強制発現させたCOS-1細胞抽出液を用いた(lane 3)場合に特異的に検出できた。この特異的なタンパク質/DNA複合体はHA抗体でスーパーシフトする(lane 4)が、HAタグを認識しない抗体ではスーパーシフトしない(lane 5)ことから、この複合体の中にPNRタンパク質が含まれていることが確認できた。

次に非標識プローブによる競合実験を行って、この結合が2コピーのAAGTCAモチーフを特異的に認識しているのかどうかを検討した。まずKni x1プローブでは競合が起こればならず(lane 9, 10)、またAAGTCAモチーフ中の3番目のグアニンをチミンに変えたコールドプローブ(3MT)でも競合が起こればならない(lane 11, 12)ことから、PNRはKni x2プローブ中のAAGTCAモチーフを特異的に認識し、二量体を形成して結合していることが示唆された。

一方COS-1細胞で強制発現させたTLXタンパク質とKni x2プローブを用いたゲルシフト(lane 14)ではそれぞれ単量体(下のバンド)、二量体(上のバンド)に対応すると考えられる2本のバンドが検出出来る。この二本のシグナルは、非標識のKni x2あるいはKni x1プローブのいずれによっても競合が起きるが、3MTプローブでは競合が起きないことから、TLXがAAGTCAの1コピーを認識して結合し得るという考えを支持する。

PNRの移動度がTLXで二量体に相当すると考えられるシグナルとほぼ同じ位置にくることからも、PNRが二量体を形成して標的配列に結合していることが示唆される。

以上の結果から、予想に反して、PNRのようにP box中1番目のアミノ酸残基がアスパラギン残基(N)を持つタイプでも、TLXの標的配列を認識し得るということが判明した。

3.5.2 ヒト・トリPNRの標的配列認識における相同性

トリPNRを用いた場合でもヒトPNRと同様の標的配列特異性を示すのかどうかを検討するため、まずHA-タグを融合させたトリPNRタンパク質を発現するプラスミドを作製し、COS-1細胞で強制発現させたタンパク質とkni x2プローブを用いてヒトPNRの場合と同様のゲルシフトアッセイを行って検討したところ、ヒトPNRの場合とほぼ同じ移動度の特異的な結合を認めることができた(データは示していない)。また、この特異的なタンパク質/DNA複合体はHA抗体でスーパーシフトするが、HAタグを認識しない抗体ではスーパーシフトしないことから、この複合体の中にトリPNRタンパク質が含まれていることが確認できた(データは示していない)。これらの結果から、ヒト・トリのPNRは同じ標的配列特異性を持つことが示唆された。

これまでの実験では、COS-1細胞抽出液を用いていたため、PNRタンパク質がホモ二量体を形成して標的配列に結合しているのか、あるいはCOS-1細胞抽出液中に含まれるなんらかの補因子とヘテロ二量体を形成しているのかは明らかでなかった。また、常にHA-タグが融合したPNRタンパク質を用いてきたため、そのことによる人為的な結果を観察している可能性は否定できない。そこで次に、HA-タグの融合していないトリPNRタンパク質をウサギ網状赤血球を用いた*in vitro*タンパク質合成系を用いて調製し、kni x2プローブに対してゲルシフトアッセイを行った(図3.38)。その結果、HA-タグの融

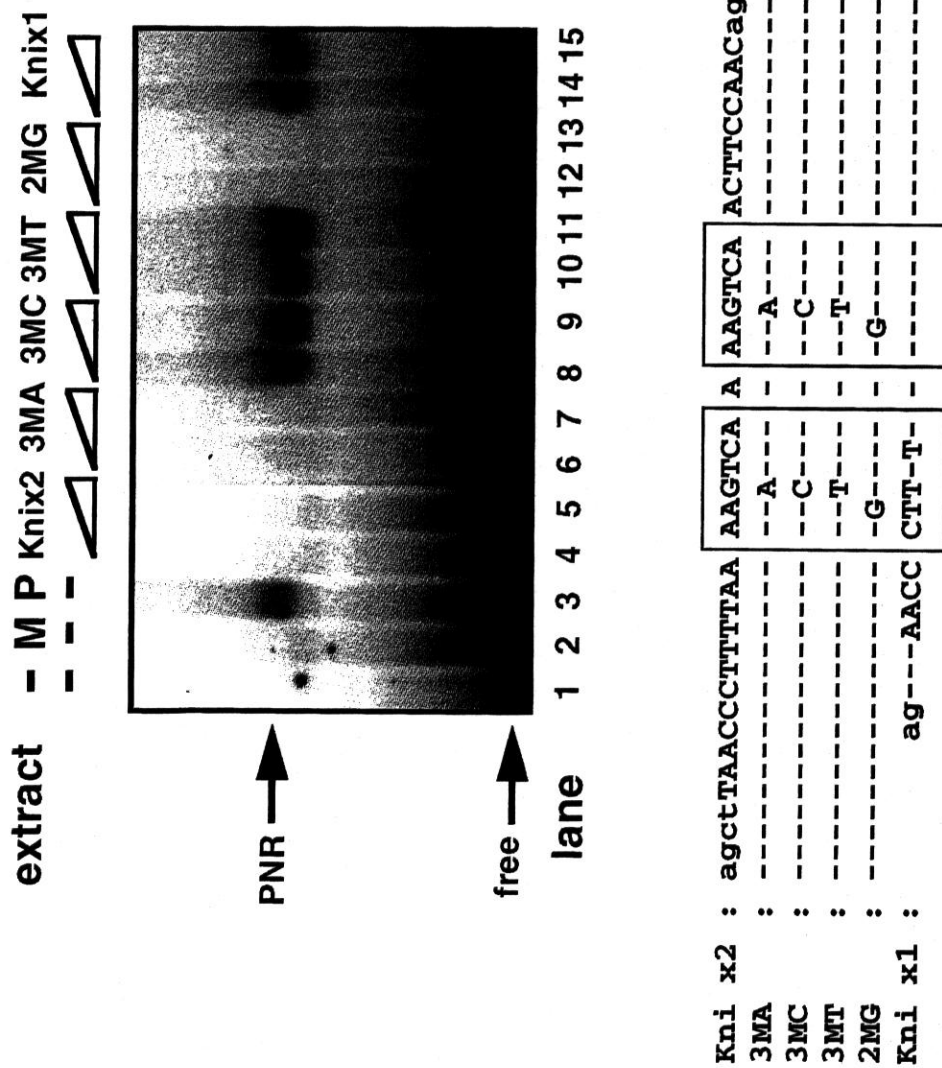


図3.38 トリPNRの標的結合モチーフ特異性

発現ベクターのみ(M)、あるいは、トリPNR(P)を *in vitro* で調製し、標識したKnix2プロローブに対する競合実験を行った。レーンの上示した非標識の各プロローブをそれぞれ10倍、50倍量過剰に加えた。PNRに特異的なバンドの位置、freeプロローブの位置を矢印で、用いた競合用プロローブの配列を図の下に、5'突出の一本鎖になっている部分は小文字で、またKnix2と同一の塩基は-でそれぞれ示した。

合したPNRタンパク質を用いた場合よりやや早い移動度の位置に特異的な結合を認めることができた(図3.38; lane 3; データは示していない)。この移動度の違いはHA-タグのあるなしによるタンパク質の大きさに由来すると考えられる。

3.5.3 PNRの結合基本モチーフに対する特異性

PNRが標的配列を認識する際の、結合基本モチーフに関する特異性を検討するため、Kni x2プローブの結合基本モチーフを置換した非標識プローブを用いた競合実験を行った(図3.38)。先に述べたように、PNRの標的配列は他の核内レセプターとは、結合基本モチーフの2から4番目に変化している可能性が高いため、まず3番目の塩基を順次置換した非標識プローブを作製して検討した(lane 6-11)。その結果、3番目をアデニン(A)に置換したプローブ(3MA)ではKni x2プローブと同程度の競合が観察できたが、シトシン(C)あるいはチミン(T)に置換したプローブ(3MC, 3MT)では競合が観察出来なかった(図3.38 lane 3-11)。この結果から3番目の塩基はプリン塩基であれば良く、AとGの間での選択性はそれほどないことがわかった。

次に2番目の塩基を置換して検討することとした。TLXではP box中で4番目のリジン残基(K)がセリン残基(S)に置き換わることによって、2番目の塩基としてグアニン(G)ではなくアデニン(A)を特異的に認識するようになり、シトシン(C)あるいはチミン(T)に置き換わったプローブにも結合しないことが知られている(野崎 1996)。そこで2番目の塩基をグアニン(G)に置換したプローブ(2MG)を作製して検討した(図3.38 lane 12, 13)。その結果、2番目の塩基としてもプリン塩基であれば良く、AとGの間での選択性はそれほどないことがわかった。

4番目の塩基に対する特異性については今後検討する予定である。

3.5.4 PNRの標的配列特異性

Kni x2プローブの中でPNRの結合に重要な領域を特定するため、Kni x2プローブに順次3塩基ずつ置換を導入した非標識プローブを用いて競合実験を行った(図3.39)。その結果、M-1, M-2, M-3, M-8の各非標識プローブを用いた場合はKni x2非標識プローブを用いた場合と同程度の強い競合が観察された。また、M-5, M-7では弱い競合が見られ、M-4, M-6では競合が見られなかった。これらの結果から、Kni x2配列の中でPNRの結合に重要な領域はAAGTCAが一塩基対をはさんで反復した配列付近(図3.39; 影を付けた領域)であることが明らかとなった。これらの結果をまとめると、PNRの標的配列としてRRRTCAAARTCAという配列が導き出せる(図3.40)。

以上の結果をまとめると、PNRタンパク質のDNA結合にはホモ二量体形成が必須であり、RRRTCAが間に1塩基対をはさんで反復した配列を標的として結合し得ることが明らかとなった。

						competition	
Kni x2	:	TAACCCTTTTAA	AAGTCA	A	AAGTCA	ACTTCCAAC	+
M-3	:	-----	GGA---	-	-----	-----	+
2MG	:	-----	-G----	-	-G----	-----	+
3MA	:	-----	--A----	-	--A----	-----	+
3MC	:	-----	--C----	-	--C----	-----	-
3MT	:	-----	--T----	-	--T----	-----	-
M-4	:	-----	---CTG	-	-----	-----	-
M-5	:	-----	-----	G	GG----	-----	-
M-6	:	-----	-----	-	--ACT-	-----	-
M-7	:	-----	-----	-	-----G	GT-----	(±)
consensus			RRRTCA	A	ARRTCA		

図 3.4 0 PNRの標的配列

非標識プローブを用いた競合実験から得られた結果をまとめると PNRの標的配列として上に示したコンセンサス配列が得られる。

4. 考察

4.1 脊椎動物におけるRAR β 遺伝子転写機構の保存

ヒトやマウスではRAR β 遺伝子のプロモーター領域にRA応答配列(β RARE)の存在が明らかにされておりRAR自身の発現がRAによって増幅されることが知られていた(de Thé et al., 1990; Sucov et al., 1990)。トリではRAR β 遺伝子の発現がRAによって増幅される(Noji et al., 1991)ことは知られていたが、トリについてはそのプロモーター領域の構造が明らかにされていないため、作用機構はこれまで明らかではなかった。そこで今回トリRAR β 2プロモーター領域を単離することにより、その機構がプロモーター構造の上で保存されていることを明らかにした。今回解析を行ったRAR β 2プロモーター領域では転写開始点付近の140塩基にわたる領域でトリ・ヒト・マウス間で実に92%という高い相同性が観察された。同じ核内レセプターファミリーに属し、卵巣などでの特異的な発現が知られているエストロゲンレセプター(ER)遺伝子では同様の140塩基にわたる領域で約72%の相同性を示すことが示されている(Nestor et al. 1994)が、RAR β 2プロモーターにおけるさらに高い相同性は、このプロモーターが単なる部位特異的な発現を制御する以上の重要な機能を持つことを示唆していると考えられる。

一方、これまでにRAR β 遺伝子産物には様々なアイソフォームが存在することが知られており、マウスではRAR β 4アイソフォーム(トリでは β 4Mに相当する)が特異的に細胞の増殖を促進すると報告されている(Bérard et al., 1994)。また、それぞれのアイソフォームごとに種間で高い保存度を示すこと、発生段階でそれぞれに部位特異的な発現パターンを示すことから、アイソフォームごとの違いには重要な意味があると考えられている(Chambon, 1995)。今回トリ胚で、新規のもの(β 4'、 β 4M、 β 4M')を含めて5つの、RAR β 2プロモーターに由来するRAR β アイソフォームを同定した。その結果、マウス・ヒトRAR β の5'非翻訳領域に見られる機能的なORF(Reynolds et al., 1996)やマウス β 4で見られるCTGの開始コドン(Nagpal et al., 1992)、スプライシングの起きる位置(Zelent et al., 1991)等が、トリでも同じ位置に存在することを明らかにした。

今回同定した β 4と β 4'、 β 4Mと β 4M'はそれぞれわずか1アミノ酸残基のみが異なっており、これらの違いはイントロンのアクセプターサイトがコドン1つ分ずれることによって生じていると考えられる(図3.1; 図3.2)。しかし、マウスでは塩基配列から推測する限り、a1とa4のアクセプターサイトは存在しない(図3.2)(Zelent et al., 1991)ため、 β 4'と β 4M'に相当するマウスのアイソフォームは存在しないと考えられる。また、このような1アミノ酸残基の違いを生じるようなアイソフォームというものはこれまでのところ報告がない。これらのわずかな違いを持ったアイソフォームどうしは機能的には同等と考えられ、スプライシング反応の際の揺らぎを反映しているものと考えられる。なおトリRAR β 4に相当するスプライシングは塩基配列の上からはマウスでも可能であるが、この転写産物の存在は他の動物種では報告されていない。at-RAによってRAR β の発現が誘導されることが知られているマウス胚性腫瘍細胞株F9(Nagpal et al., 1992)からRNAを抽出してRT-PCR法によって解析した結果、 β 2、 β 4の発現は確認できたが、やはりトリ β 4に相当する転写産物の発現は確認できなかった。

今回培養した神経網膜細胞ではat-RA添加によってRAR β 2プロモーターに由来する全

てのアイソフォームが誘導されてきた。また、3つのバンドパターンは調べた限りどの組織でも見られた。しかし今回扱った組織は多様な細胞の集団としての器官ごとに解析しているため、より細かい細胞レベルではアイソフォームによって発現パターンが異なっている可能性もある。現在用いられている *in situ* ハイブリダイゼーションなどの技術では細かいアイソフォームの違いを見分けることは困難であるが、1細胞からのPCR法などを用いて検討することによって新たな知見が得られる可能性もある。

マウスにおいて、10日から16日目胚の網膜ではRAの合成が非常に盛んであることが知られており (McCaffery et al., 1993)、*RAR* β 2プロモーターを持つLacZのレポーター遺伝子を導入したマウス14.5日目胚では、網膜でシグナルが検出される (Reynolds et al., 1991; Mendelsohn et al., 1991)。また、*RAR* β 遺伝子を欠失したマウスは発育に大きな影響が見られないと報告されているが、*RAR* β 2/ α 、*RAR* β 2/ γ 、あるいは*RAR* β / γ の二重欠失マウスでは、水晶体形成や瞼の形成に異常が見られること (Kastner et al., 1995; Ghyselinck et al., 1997)、構成的に転写を活性化する*RAR*を導入したマウスでは水晶体の形成不全が起こること (Balkan, et al., 1992)が報告されており、眼の器官形成において*RAR* β 遺伝子が重要な機能を担っていることが示唆されている。

4.2 細胞種特異的な*RAR* β 遺伝子の転写調節

RAの効果は主に*RAR*・*RXR*を介して発揮されると考えられるが、*RAR*・*RXR*の発現パターンからだけでは、RAの広範囲な効果を説明することは出来ない。脊椎動物で胚発生の時期にat-RAを投与すると網膜で強い催奇性を示すことが知られている (Hyatt et al., 1996)が、今回トリ神経網膜細胞中では、線芽細胞株や骨芽細胞株に比べて*RAR* β 2プロモーターがRAに非常によく応答することを明らかにした。マウスの胚性腫瘍細胞株P19を用いた研究から、未分化な細胞ではアデノウイルスE1Aタンパク質様の活性が*RAR*や基本転写因子のTFIIDと協調的に働くことによって*RAR* β 2プロモーターのRA応答能を上昇させるという報告がある (Berkenstam et al., 1992; Kruyt et al., 1993)。しかし今回我々は、もともと*RXR*に類似のcDNAとしてクローニングされたオーファンレセプターのTLXが、線維芽細胞中での*RAR* β 2プロモーターのat-RA応答能を上昇させることを見出した。TLXは神経網膜や前脳部に限局した時期・部位特異的な発現パターンを示すことから、細胞種特異的なRAの作用機構に*RAR*・*RXR*以外の核内レセプターが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

RAR β 2プロモーターに順次欠失を導入したレポータープラスミドを作製し、TLXと同時にCV-1細胞中に導入して検討した結果、*RAR* β 2プロモーター上のMDR配列と名付けた約20bpの領域を欠くと*RAR* β 2プロモーターのTLXに応答した転写活性化が見られなくなることを見出した(図3.5)。ところがTKプロモーター上での再構成実験からMDR配列のみではTLX応答性配列として機能出来ないことが、またゲルシフト法を用いた解析からTLXタンパク質はMDR配列に結合出来ないことが、それぞれ判明した(図3.6)。そこでMDR配列と β RARE配列を1コピーずつTKプロモーターの上流に組み込んだレポータープラスミド(MDR- β RARE-TK-LUC、 β RARE-MDR-TK-LUC)を用いた解析の結果、MDR配列はCV-1細胞中では本来 β RAREの持つat-RA応答能を抑制することが判

明した(図3.8, データは示していない)。さらにTLXを同時に強制発現させると、このレポーターのRA応答能は上昇するが、 β RAREのみを持つレポーターと同程度までしか活性化されない(図3.8)。これらの結果から、この場合TLXはMDR配列の持つ抑制効果を解除するのみで、積極的に活性化するわけではないと解釈できる。しかしこの結果は、RAR β 2プロモーター上でMDR配列を欠失し、 β RARE配列のみを持つレポータープラスミド(図3.5; -66まで欠失したレポーター)ではat-RAに対する応答性が悪くなってしまうという結果と見かけ上矛盾する。これは、RAR β 2プロモーターの活性がCV-1細胞中では弱いために、MDR配列を持たない状態でも十分な転写活性化が検出出来ないためであると解釈出来る。以上の結果をまとめると、CV-1細胞中でat-RAとTLXに応答した転写活性化が起こるといふ現象は、RAR β 2プロモーターにおいても、TKプロモーター上に再構成したレポーターにおいても、MDR配列と β RARE配列に依存して観察できる。また、TLXのショウジョウバエにおける相同タンパク質と考えられるTLLを用いた場合でも同様の効果が観察できるが、TLXのDBDあるいはLBDを欠いたタンパク質や、RXR、PNRを始めとする24種の他のオーファンレセプターにはこのような活性は認められないことから、この活性にはTLXとTLLに共通の構造が必要であることが示唆されている。

4.3 TLXによるRAR β 遺伝子の転写調節機構

ショウジョウバエの*tailless (tll)*は、遺伝学的にギャップ遺伝子*krüppel*、*Knirps*の上位にあってそれらの発現を抑制する(Hulskamp and Tautz, 1991)こと、またそれぞれの遺伝子のエンハンサー領域にTLLが単独で直接結合すること(Hoch et al., 1992; Pankratz et al., 1992)が知られている。しかし一方で初期ペアルール遺伝子である*hairy*の発現を活性化する(Mahoney and Lengyel, 1987)ことが報告されており、TLLは転写活性化・抑制の機能を併せ持つとされている(Steingrimsson et al., 1991)。

一方、脊椎動物のTLXはRAR β 2プロモーターに対してRA応答性の転写活性化因子として働くことが明らかとなり、4.2で論じたようにこの場合TLXはプロモーターには直接結合していないと考えられる。

ホメオボックスタンパク質である*engrailed*の転写抑制領域(EnR)は、その領域を他の転写因子に融合した場合にも転写抑制領域として機能することが知られている(Jaynes and O'Farrell, 1991)。そこでTLXのDBDをEnRに融合したタンパク質を強制発現させRAR β 2プロモーターに対する効果を検討したが、転写抑制効果は観察できなかった(データは示していない)。このことから、TLXはRAR β 2プロモーター上に結合配列を持たないことが示唆される。

ところがAAGTCAモチーフを1コピー持ち、TLXタンパク質が結合し得ることが知られている*krüppel*配列をTKプロモーターの上流に導入したレポータープラスミドに対しては、TLXが転写抑制因子として働くことを明らかにした(図3.12)。TLXはまた、眼の器官形成に重要な機能を持つホメオボックス遺伝子であるPAX2遺伝子のプロモーターに対して抑制的に働くことが知られている(Ruth YU; 私信)。このプロモーター上には、AAGTCAモチーフが1コピー存在し、この付近の領域はヒト・マウスで保存されている(Ryan et al., 1995; Sanyanusin et al., 1995)。そこでPAX2プロモーター上のAAGTCAを含む

25塩基対のオリゴヌクレオチドプローブを放射性標識してゲルシフトアッセイを行った結果、TLXタンパク質がこの領域に結合し得ることが判明した(データは示していない)。これらの結果からTLXは、直接プロモーターに結合した場合、そのプロモーターの活性を抑制することが判明した。

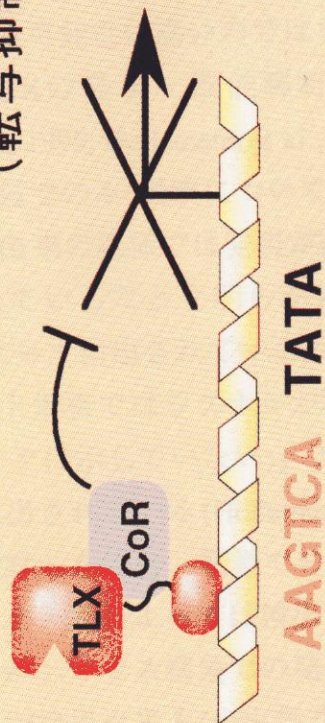
このように脊椎動物TLXは、TLLで報告されているように、その標的とするプロモーターによって、転写を活性化したり抑制したりする機能を持つことがわかってきた。TLXのLBDはTLLと約40%の相同性を持ち、TLXと同じサブファミリーに属するオーファンレセプターであるCOUPとの相同性も約40%である。COUPはヒトからウニまでその相同遺伝子の存在が知られており、時期・部位特異的な発現パターンの一部がTLXのそれと重なる(Tsai et al, 1997)。COUPタンパク質は、やはり標的とするプロモーターによって、転写を活性化したり抑制したりする機能を持つことが報告されており、上で論じたTLXの機能を考察する上で興味深い。

肝臓特異的な発現を規定する*HNF-1*プロモーターに対しては、やはりTLX、COUPと同じサブファミリーに属するオーファンレセプターHNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4)が結合して転写を活性化することが知られているが、この時COUPを同時に強制発現させると、HNF4の転写活性化能を上昇させることが報告されている(Ktistaki et al, 1997)。COUPタンパク質はこのプロモーター上には結合サイトをもたず、この現象はCOUPがHNF4のLBDとタンパク質間相互作用することによって、HNF4の転写活性化能を高める結果であると説明されている。

ニジマスエストロゲンレセプター(ER)遺伝子プロモーターに対して、ERはそのリガンドであるエストラジオールに応答して転写を活性化する。この時、COUPあるいはリガンドが無い状態のRAR/RXRを同時に強制発現させると、この転写活性化をさらに促進するということが報告されている(Lazennec et al., 1997)。この現象はCOUPとERのタンパク質間相互作用に加えて、COUPが標的DNAの高次構造を変化させることによってERのDNA結合活性を上昇させるためであると説明されているが、ここでのCOUPとERの関係は、RAR β 2プロモーターに対するTLXとRARの関係に非常に類似している。

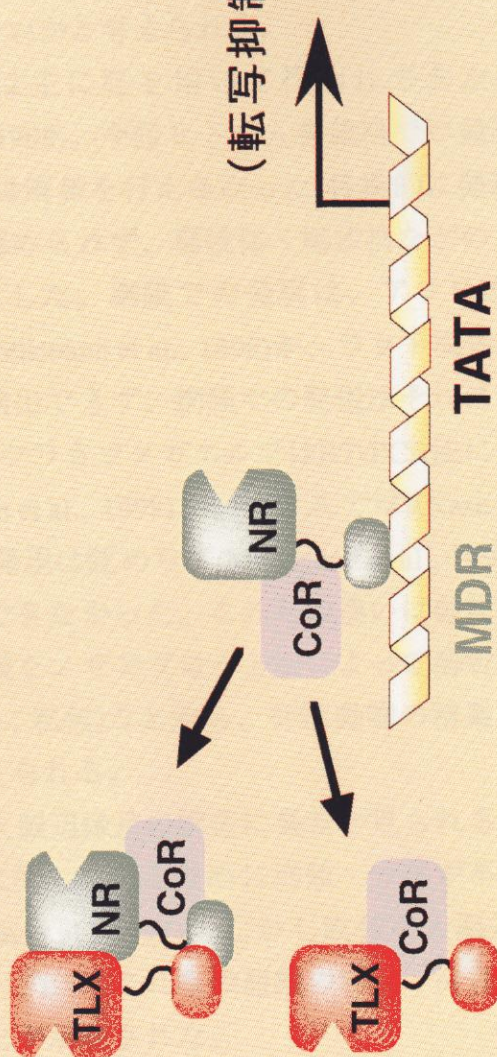
これらの結果をまとめて考えると、TLXによる転写調節機構として図4.1のようなモデルが考えられる。即ち、COUP/TLXファミリーに共通な共役抑制因子(CoR)が存在し、TLXがプロモーターに結合している際にはTLXと結合しているCoRによって転写が抑制され、逆にTLXがプロモーターに結合していない場合は、プロモーター上に結合して抑制的に機能している他の核内レセプター(NR)からCoRを競合的に奪うか、あるいはTLXがNRと直接相互作用することでNRのDNA結合活性を阻害することによってCoRによる転写の抑制効果を解除し、脱抑制という形で見かけ上転写を活性化するというモデルである。MDR配列はトリからヒトまで完全に保存されており(図3.5)、その構造は核内レセプター標的配列にきわめて類似している(図3.6A)。またRARや甲状腺ホルモンレセプター(TR)、それにCOUPの標的配列として知られているTREp配列(Umesono et al., 1988)をTKプロモーターの上流に組み込んだレポータープラスミドに対してもTLXはat-RAに依存した転写活性化を促進する(データは示していない)ことから、このモデルが支持される。しかし、これ以上詳しい機構についてはまだ不明な点が多い。

(転写抑制)



Kruppel
Pax 2

(転写抑制の解除)



RARβ2

図4.1 TLXによる転写調節機構のモデル

TLXは共役転写抑制因子(CoR)と結合し、TLXの結合配列を持つプロモーターに対しては抑制的に働く(Kruppel、Pax2プロモーター)。一方、他の核内レセプター(NR)の結合配列に対しては、共役転写抑制因子(CoR)を競合的に奪うか、あるいはNRとの直接の相互作用によってNRの標的配列への結合を阻害することにより、抑制の解除を行う(RARβ2プロモーター)。

4.4 成体におけるTLXの発現と機能

今回ヒトTLXを同定することにより、TLXタンパク質が進化の過程で強く保存されていることを明らかにした(図3.11A)。TLXのリガンドは未同定であるが、LBDの構造が高い保存度を示すことから、この領域と相互作用する脂溶性の低分子あるいはタンパク質が存在する可能性は高いのではないかと考えられる。

これまでTLXの発現・機能解析は主に胚を用いて行われてきた(Yu et al., 1994; Monaghan et al., 1995; Hollemann et al., 1998)。今回ヒト成人各組織での発現パターンを解析し、TLXは脳でのみ(網膜については解析を行えなかった)特異的に発現し、また脳の中でも、小脳由来の組織では発現が認められず、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を明らかにした。網膜での発現は、アフリカツメガエルでRT-PCR法によって検出されている(Hollemann et al., 1998)が、ラット成体各組織を用いたノザンプロット解析ではシグナルが検出できず、網膜での発現はそれほど高くないと考えられる(データは示していない)。アフリカツメガエルではRT-PCR法によって精巣における発現も検出されている(Hollemann et al., 1998)が、マウスではRNaseプロテクション法を用いて検討した場合、精巣での発現は認められず(Monaghan et al., 1995)、ヒトでも今回ノザンプロット法によっては検出できなかった。これらの違いは動物種の違いによる可能性もあるが、マウス精巣での発現をノザンプロット法によって解析した結果非常に弱いシグナルが検出出来る(小出哲也; 私信)ことから、脊椎動物の精巣では極めて弱いながらTLXは発現しているものと考えられる。

TLX遺伝子を欠失したマウスでは大脳辺縁系の構造に異常が見られるが、これは本来TLXを発現している細胞が、TLXを欠失しているために増殖・分化が不可能となったためであると説明されている(Monaghan et al., 1997)。しかし成体の大脳辺縁系組織でもTLXの高い発現が見られることから、TLXはこれらの組織の増殖・分化のみならず、その機能維持のためにも必要であることが示唆された。

今回様々な組織に由来するヒト細胞株20株について、RT-PCR法、ノザンプロット法を用いて検討した結果、神経上皮由来の細胞株SK-N-MCの他に、結腸癌株(Caco-2)、アデノウイルスで形質転換した線維芽細胞株(293)でTLXの強い発現が見られることを明らかにした(図3.15)。強制的にTLXを発現させた線維芽細胞は軟寒天中でも増殖が可能となること(Ruth YU; 私信)から、TLXには細胞の増殖能を高める機能があることが示唆されているが、今後TLXのプロモーター領域を同定し、これらの細胞株を用いてその発現機構を検討することによって、TLXの発現と細胞増殖能との相関関係を明らかにしていくことが出来ると考えられる。なおヒトTLXの同定は、最近Jacksonらによっても報告された(Jackson et al., 1998)。

4.5 新規核内レセプター-PNRの同定

今回同定したPNRは、標的配列の認識に重要なP boxの最初のアミノ酸残基にアスパラギンを持つという、脊椎動物で初めて同定されたタイプの核内レセプターである。タンパク質全体の構造からは、RXRやCOUP、HNF4など、ホモ二量体を形成して標的配列に結合するタイプのオーファンレセプターと同じサブファミリーに分類することが出来、中でもTLXに最も高い相同性を示す。このサブファミリーは、ステロイドレセプターやRARよりも進化的に起源が古いと考えられており、その相同タンパク質が線虫やショウジョウバエにも見出せるという特徴も持っている(Mangelsdorf et al., 1995)。PNRの場合も、その相同遺伝子がヒト・マウス・トリをはじめとする脊椎動物からショウジョウバエ、線虫にまで見出された。

最近ゲノムの全塩基配列が決定された線虫では、核内レセプター型の転写因子をコードすると考えられる遺伝子が約200見つかっており、これは線虫ゲノムに見つけられる転写因子ファミリーの中では最大のものである(Clarke and Berg, 1998)。脊椎動物で同定されている核内レセプターは約50であるが、線虫からヒトまで保存されている核内レセプターのタイプは、全て、RXRやCOUPを含むサブファミリー(図3.21)に分類できるものばかりである。PNRとTLXに対してはそれぞれ別の線虫オルソログが存在し、これらは進化的に独自に分岐した異なる遺伝子であると考えられる。PNR、TLXいずれの場合も進化の過程で保存されているのはDBDに限られているが、これは線虫における核内レセプターの一般的な特徴となっている。

4.6 PNRの発現特異性

PNRは、ESTデータベース中では網膜由来のライブラリーからのみ見出され、ノザンプロット法及び*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて検討した結果、齧歯類・鳥類においてその発現が網膜の視細胞層でのみ見られることを明らかにした。またトリにおいてPNRの発現は、発生途上においても神経網膜に限局し、網膜視細胞が分化し始める5日目以降に見られるようになる。このようにPNRの発現特異性は種を越えて保存されている。

視細胞特異的に発現する転写因子としては、これまでホメオボックス遺伝子のCRX(Chen et al., 1997; Freund et al., 1997; Furukawa et al., 1997)とErx(Martinez et al., 1998)が知られているのみであり、核内レセプターの中では、視細胞に限らず、これほど発現部位が限局している例はこれまで知られていない。CRX遺伝子はCORDIIに分類されるヒト遺伝性網膜変性症の原因遺伝子として知られている(Freund et al., 1997; Swain et al., 1997)。また、マウス網膜でCRXタンパク質を強制発現させると視細胞の分化を促進し、優勢的阻害を行う(dominant negative) CRXタンパク質の変異体を発現させると、視細胞の分化を阻害することから、CRXは視細胞の分化に重要な役割を担っていると考えられている

(Furukawa et al., 1997)。今回、マウスの網膜視細胞層とヒトY79細胞株でCRXとPNRが同時に発現していることを明らかにし、PNRとCRXが視細胞の分化・機能維持に関わる転写因子カスケードの一員であることを示唆した。

また、発生過程のマウス網膜からRNAを抽出し、RT-PCR法を用いてCRX、PNRの発現を検討したところ、胚性13.5日目でCRXの発現が認められるが、この時期にPNRの発現は検出できず、PNRに先んじてCRXの発現が見られることがわかった(Ruth YU; 私信)。PNRのプロモーター領域にはCRXの結合配列が見出せる(データは示していない)ことから、CRXが視細胞特異的なPNRの発現調節を担っている可能性が示唆されている。

4.7 視細胞におけるPNRの機能

一部のステロイドホルモンレセプターを除いて、核内レセプターは標的配列の認識に重要なP boxの最初のアミノ酸残基にグルタミン酸残基(E)あるいはアスパラギン酸残基(D)の酸性アミノ酸残基を持ち、TLXを除く全ての核内レセプターで、4番目のアミノ酸残基にリジン残基(K)を持つ(図3.17)。PNRはP boxの1番目、4番目のアミノ酸残基にそれぞれアスパラギン残基(N)、セリン残基(S)を持つという、脊椎動物で初めて同定されたタイプの核内レセプターである。従ってPNRはこれまでに知られていない新たな標的配列を認識して結合することが予想された。COS細胞中で、あるいは*in vitro*で調製したPNRタンパク質を用いたゲルシフトアッセイの結果、PNRのDNA結合にはPNRのホモ二量体形成が必須であることが分かった。また、PNRの標的配列のコンセンサス配列として、RRRTCAが間に一塩基対をはさんで反復した配列(PNRE)が得られ、PNRはTLXと同じAAGTCAモチーフを認識して結合し得ることが分かった。このことは、P boxの1番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸残基(D)からアスパラギン残基(N)に置き換わった場合、積極的に異なった標的配列を認識するようになるというよりも、アスパラギン酸残基(D)の場合に比べて標的配列の認識が甘くなると解釈することが出来る。しかし、TLXとは異なり、DNA結合に二量体形成を必須とすることによって標的配列の特異性を確保していると考えられる。

オプシン、光受容細胞間レチノイド結合タンパク質、アレクチン遺伝子など、視細胞特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域をレポーター遺伝子上流に組み込み、そのレポーター遺伝子を導入したマウスを用いた実験から、視細胞特異的な発現を規定するエンハンサー領域が同定されており、そのエンハンサー領域には*in vitro*でCRXやErxが結合して転写を活性化することが知られている(Chen S. et al., 1997; Freund et al., 1997; Furukawa et al., 1997)。また、オプシン遺伝子のプロモーター領域には、網膜で強い発現が見られるbZIP型転写因子のNRLが単独で、あるいはCRXと協調的に転写活性化することの出来る領域が同定されている(Chen S. et al., 1997; Kumar et al., 1996; Rehemtulla et al., 1996)。しかしながら、これらの視細胞特異的な発現に重要なプロモーター領域には

PNRE配列に相当するものは見出せない。これはどのように解釈すればよいであろうか？

酵母転写因子GAL4のDBDにPNRのLBDを融合したプラスミド(GAL-PNR)を作製し、CV-1細胞中で強制発現させると、GAL4の結合配列を持つレポータープラスミドに対して転写抑制的に働くことが分かっている(データは示していない)。また、これまでに知られている視細胞特異的な転写因子群はいずれも転写活性化因子である。これらの実験事実からPNRは、視細胞の中で、視細胞への分化に拮抗する遺伝子のプロモーター活性を特異的に抑えているのではないかと考えられる。

Y79細胞ではPNR、CRXに加えてErx、NRLの発現も見られることから、視細胞的な性格を維持した細胞株であると考えられるが、オプシンの発現は認められない(Martinez et al., 1998)。したがって、Y79細胞では視細胞へ最終的に分化するための要因が欠けているものと解釈でき、その要因の1つとして、PNRのリガンドを想定することも可能である。隣接する網膜色素上皮からのシグナルに応答して視細胞の分化が進行するという報告がある(Watanabe et al., 1992; Stiemke et al., 1994)他、網膜の機能維持にはレチノイドが必須であるため、視細胞層では、光刺激に応答したレチノイドの代謝・輸送経路があることが知られており(図4.2)(Wright et al., 1997)、PNRのリガンド候補としてはレチノイドの代謝物が最も魅力的である。そこでGAL-PNRをCV-1細胞中あるいはY79細胞中で強制発現させて種々のレチノイドに対する応答を検討したが、これまでのところPNRの活性を制御するようなりガンド候補は同定されていない。

またヒトPNR遺伝子座を15q24に特定したが、この領域における染色体異常との連関が指摘されている遺伝性網膜疾患において、実際にPNR遺伝子の変異が伴っているかどうかを解析することにより、結果としてPNRの機能が推測できることが期待される。また、PNRの発現が網膜で特異的であることから、PNR遺伝子を欠失したマウスでも胚性致死とはならない可能性が高く、このアプローチからもPNRの機能解析が進められることが期待される。

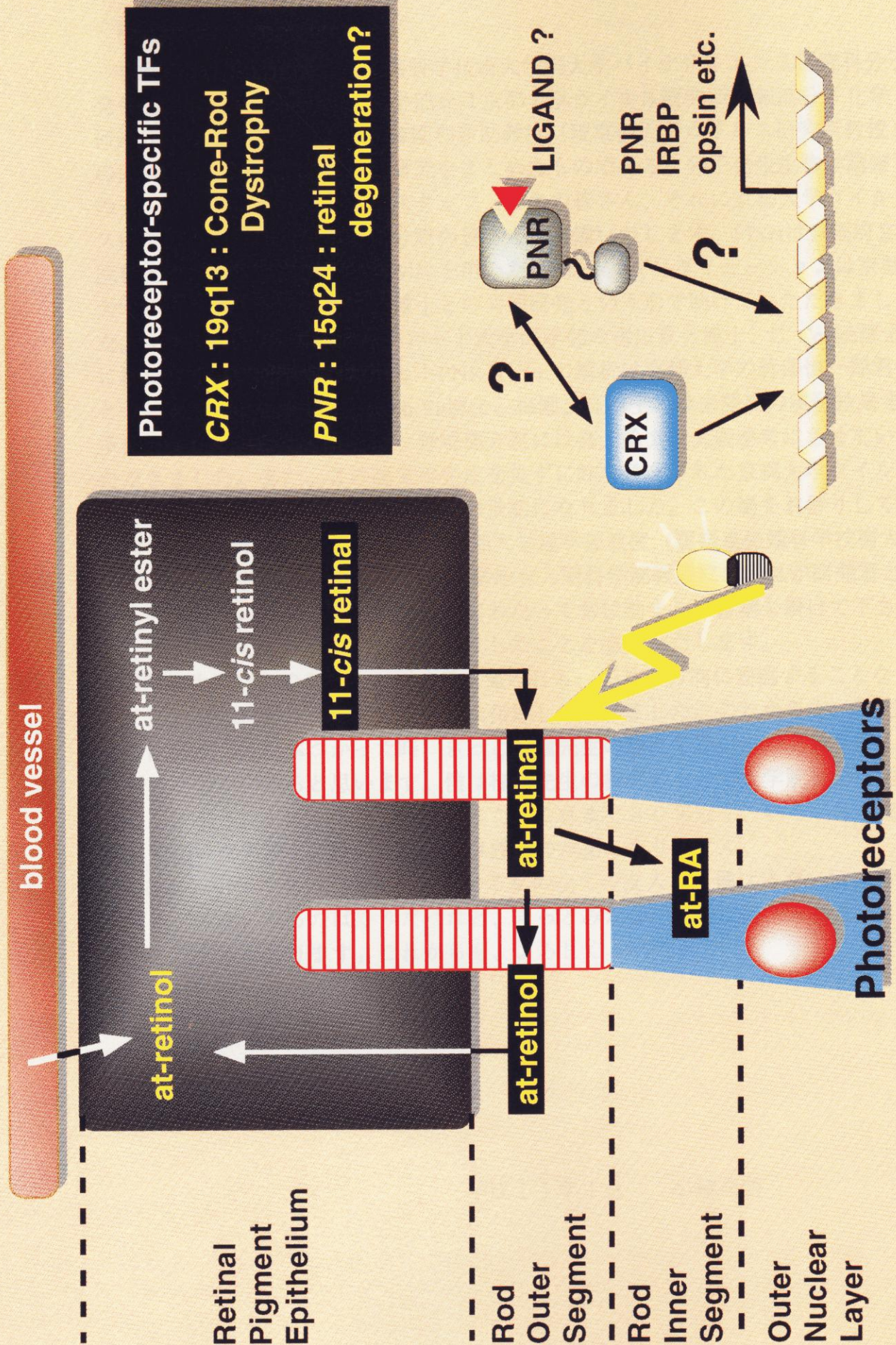


図 4.2 網膜におけるレチノイドの代謝とPNR

5. 謝辞

本論文の前半部分は奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科分子発生生物学講座で3年間、後半部分は京都大学ウイルス研究所情報高分子化学研究分野で2年間、いずれも梅園和彦助教授（現京都大学ウイルス研究所教授）の直接の指導のもとに行った研究をまとめたものである。分子発生生物学講座の安田國雄教授を始めとするスタッフ、学生の皆さん、それに京都大学ウイルス研究所情報高分子化学研究分野の皆さんに感謝いたします。FISHは京都府立医科大学の谷脇雅史博士と、切片を用いた*in situ*ハイブリダイゼーションは京都大学ウイルス研究所の原健二博士との共同研究という形で助けていただきました。マウスCRXのcDNAはハーバード大学医学部の古川貴久博士、C. Cepko博士に提供していただきました。ヒトPNR遺伝子の解析は京都大学の竹澤慎一郎君と一緒に行ったものです。Ruth Yu博士、梅園良彦博士には未発表の実験結果を多数提供していただきました。野崎健介君には修士論文を大変参考にさせていただきました。また、この論文の完成を見ずに昨年急逝された京都大学ウイルス研究所の田中喜代子さんには大変お世話になりました。この場をお借りして感謝いたします。また、山田康之 京都大学農学部教授（現奈良先端科学技術大学院大学長）並びに丸山圭蔵 京都大学総合人間科学部教授には、私が研究者としての道を歩み始めて以来、9年間にわたって常に励ましの言葉を掛けて下さり、時には厳しく指導していただきましたことを感謝いたします。

梅園先生にはこの5年間、雨の日も風の日も、安易な方向に妥協することなく常に変わらぬ真摯な態度で大変熱心に指導して頂きました。これから先、研究上で困難なことにおつかった時、きっと梅園先生の態度を思い出して乗り越えて行くことが出来ると思います。僕は梅園先生の指導のもとで大学院生活を送ることができ、とても幸せでした。また、これまで30年近く、いろいろと支援して頂いた両親と家族のみんなには感謝の言葉もありません。

最後に、いつでも応援してくれている私の全ての友人に。僕はまだ、研究者としてスタートに立ったばかりだけれど、きっとみんなの期待に応えられるよう立派な研究者になります。これからも、よろしく。

平成11年1月 小林未明

6. 参考文献

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology* (New York: John Wiley & Sons).
- Beato, M., Herrlich, P. and Schutz, G. (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**, 851-857.
- Berkenstam, A., Ruiz, M. M., Baretino, D., Horikoshi, M. and Stunnenberg, H. G. (1992) Cooperativity in transactivation between retinoic acid receptor and TFIID requires an activity analogous to E1A. *Cell* **69**, 401-412.
- Bérard, J. G., L., Landers, M., Repentigny, Y., Houle, B., Kothary, R. and Bradley, W. E. C. (1994) Hyperplasia and tumours in lung, breast and other tissues in mice carrying a RAR β -like transgene. *EMBO J* **13**, 5570-5580.
- Breathnach, R. and Chambon, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins *Annu Rev Biochem.* **50**, 349-383.
- Breitman, T. R., Selonick, S. E. and Collins, S. J. (1980) Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 2936-2940.
- Chambon, P. (1995) The molecular and genetic dissection of the retinoid signaling pathway. *Recent Prog Horm Res* **50**, 317-332.
- Chen, J. D. and Evans, R. M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454-457.
- Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L., Nakatani, Y., and Evans, R. M. (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* **90**, 569-580.
- Chen, S., Wang, Q. L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and Zack, D. (1997) Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* **19**, 1017-1030.
- Clarke, N. D. and Berg, J. M. (1998) Zinc fingers in *Caenorhabditis elegans*: finding families and probing pathways. *Science* **282**, 2018-2022.
- Damm, K. and Evans, R. M. (1993) Identification of a domain required for oncogenic activity and transcriptional suppression by v-erbA and thyroid-hormone receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 10668-10672.
- de The, H., Vivanco-Ruiz, M. M., Tiollais, P., Stunnenberg, H. and Dejean, A. (1990) Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor β gene. *Nature* **343**, 177-180.
- Dey, A., Minucci, S. and Ozato, K. (1994) Ligand-dependent occupancy of the retinoic acid receptor β promoter in vivo. *Mol Cell Biol* **14**, 8191-8201.
- Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M. C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R. and Laudet, V. (1997) Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 6803-6808.

- Freund, C. L., Gregory-Evans, C. Y., Furukawa, T., Papaioannou, M., Looser, J., Ploder, L., Bellingham, J., Ng, D., Herbrick, J. A., Duncan, A., Scherer, S. W., Tsui, L. C., Loutradis-Anagnostou, A., Jacobson, S. G., Cepko, C. L., Bhattacharya, S. S. and McInnes, R. R. (1997) Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell* 91, 543-553.
- Frohman, M. A., Dush, M. K. and Martin, G. R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 8998-9002.
- Furukawa, T., Morrow, E. M. and Cepko, C. L. (1997) Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91, 531-541.
- Ghyselinck, N. B., Dupe, V., Dierich, A., Messaddeq, N., Garnier, J. M., Rochette-Egly, C., Chambon, P. and Mark, M. (1997) Role of the retinoic acid receptor β (RAR β) during mouse development. *Int J Dev Biol* 41, 425-447.
- Ghyselinck, N. B., Wendling, O., Messaddeq, N., Dierich, A., Lampron, C., Decimo, D., Viville, S., Chambon, P. and Mark, M. (1998) Contribution of retinoic acid receptor β isoforms to the formation of the conotruncal septum of the embryonic heart. *Dev Biol* 198, 303-318.
- Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P. and Evans, R. M. (1987) Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330, 624-629.
- Glass, C. K., Devery, O. V. and Rosenfeld, M. G. (1990) Multiple cell type-specific proteins differentially regulate target sequence recognition by the alpha retinoic acid receptor. *Cell* 63, 729-738.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J., Argos, P. and Chambon, P. (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-139.
- Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millasseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M. and Weissenbach, J. (1994) The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat Genet* 7, 246-339.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88, 49-92.
- Hashimoto, Y., Kagechika, H., Kawachi, E. and Shudo, K. (1988) Specific uptake of retinoids into human promyelocytic leukemia cells HL-60 by retinoid-specific binding protein: possibly the true retinoid receptor. *Jap J Cancer Res* 79, 473-483.
- Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M. and Thaller, C. (1992) 9-Cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397-406.
- Hollemann, T., Bellefroid, E. and Pieler, T. (1998) The *Xenopus* homologue of the *Drosophila* gene *tailless* has a function in early eye development. *Development* 125, 2425-2432.
- Hoch, M., Gerwin, N., Taubert, H. and Jackle, H. (1992) Competition for overlapping sites in the regulatory region of the *Drosophila* gene *Kruppel*. *Science* 256, 94-97.
- Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M. (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA.

Nature 318, 635-641.

Hoover, F., Seleiro, E. A., Kielland, A., Brickell, P. M. and Glover, J. C. (1998) Retinoid X receptor gamma gene transcripts are expressed by a subset of early generated retinal cells and eventually restricted to photoreceptors. *J Comp Neurol* 391, 204-213.

Horlein, A. J., Nääf, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

Huang, M. E., Ye, Y. C., Chen, S. R., Chai, J. R., Lu, J. X., Zhao, L., Gu, L. J. and Wang, Z. Y. (1988) Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72, 567-572.

Hulskamp, M. and Tautz, D. (1991) Gap genes and gradients--the logic behind the gaps. *Bioessays* 13, 261-268.

Hyatt, G. A., Schmitt, E. A., Fadool, J. M. and Dowling, J. E. (1996) Retinoic acid alters photoreceptor development in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13298-13303.

Jackson, A., Panayiotidis, P. and Foroni, L. (1998) The human homologue of the drosophila tailless gene (TLX): characterization and mapping to a region of common deletion in human lymphoid leukemia on chromosome 6q21. *Genomics* 50, 34-43.

Jaynes, J. B. and O'Farrell, P. H. (1991) Active repression of transcription by the engrailed homeodomain protein. *EMBO J* 10, 1427-1433.

Jensen, E. V., Jacobson, H. I., Flesher, J. W., Saha, N. N., Gupta, G. N., Smith, S., Colucci, V., Shiplacoff, D., Neuman, H. G., Desombre, E. R. and Jungblut, P. W. (1966) Estrogen receptors in target tissues. In *Steroid Dynamics*, G. Pincus, T. Nakao and J. F. Tait, eds. (New York: Academic Press), pp. 133-156.

Kastner, P., Mark, M. and Chambon, P. (1995) Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83, 859-869.

Kruyt, F. A. E., Folkers, G. E., Walhout, A. J. M., van der Leede, B. M. and van der Saag, P. T. (1993) E1A functions as a coactivator of retinoic acid-dependent retinoic acid receptor-b2 promoter activation. *Mol Endocrinol* 7, 604-615.

Ktistaki, E. and Talianidis, I. (1997) Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors act as auxiliary cofactors for hepatocyte nuclear factor 4 and enhance hepatic gene expression. *Mol Cell Biol* 17, 2790-2797.

Kumar, R., Chen, S., Scheurer, D., Wang, Q. L., Duh, E., Sung, C. H., Rehemtulla, A., Swaroop, A., Adler, R. and Zack, D. J. (1996) The bZIP transcription factor Nrl stimulates rhodopsin promoter activity in primary retinal cell cultures. *J Biol Chem* 271, 29612-29618.

Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K. (1995) Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* 377, 451-454.

Lazennec, G., Kern, L., Valotaire, Y. and Salbert, G. (1997) The nuclear orphan receptors COUP-TF and ARP-1 positively regulate the trout estrogen receptor gene through enhancing autoregulation. *Mol Cell Biol* 17, 5053-5066.

Levin, A. A., Sturzenbecker, L. J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen,

- C., Rosenberger, M., Lovey, A. and Grippo, J. F. (1992) 9-Cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR α . *Nature* 355, 359-361.
- Li, W., Gruber, C. E., Noon, M. C., Polayes, D., Schmidt, B. and Jessee, J. (1995) The rapid isolation of specific genes from cDNA libraries with the GeneTrapper™ cDNA positive selection system. *FOCUS* 17(2), 45-49.
- Maden, M. (1980) Intercalary regeneration in the amphibian limb and the rule of distal transformation. *J Embryol Exp Morphol* 56, 201-209.
- Mahoney, P. A. and Lengyel, J. A. (1987) The zygotic segmentation mutant tailless alters the blastoderm fate map of the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 122, 464-470.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and Evans, R. M. (1995) The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
- Martinez, J. A. and Barnstable, C. J. (1998) Erx, a novel retina-specific homeodomain transcription factor, can interact with Ret 1/PCEI sites. *Biochem Biophys Res Commun* 250, 175-180.
- McCaffery, P., Posch, K. C., Napoli, J. L., Gudas, L. and Dräger, U. C. (1993) Changing patterns of the retinoic acid system in the developing retina. *Dev Biol* 158, 390-399.
- Mitchell, S. J., McHale, D. P., Campbell, D. A., Lench, N. J., Mueller, R. F., Bunday, S. E. and Markham, A. F. (1998) A syndrome of severe mental retardation, spasticity, and tapetoretinal degeneration linked to chromosome 15q24. *Am J Hum Genet* 62, 1070-1076.
- Monaghan, A. P., Grau, E., Bock, D. and Schutz, G. (1995) The mouse homolog of the orphan nuclear receptor tailless is expressed in the developing forebrain. *Development* 121, 839-853.
- Monaghan, A. P., Bock, D., Gass, P., Schwäger, A., Wolfer, D. P., Lipp, H.-P. and Schütz, G. (1997) Defective limbic system in mice lacking the tailless gene. *Nature* 390, 515-517.
- Nagpal, S., Zelent, A. and Chambon, P. (1992) RAR- β 4, a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR- β 2 by alternative splicing and usage of a CUG initiator codon. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2718-2722.
- Nestor, P. V., Forde, R. C., Webb, P. and Gannon, F. (1994) The genomic organisation, sequence and functional analysis of the 5' flanking region of the chicken estrogen receptor gene. *J Steroid Biochem Molec Biol* 50, 121-130.
- Nohno, T., Muto, K., Noji, S., Saito, T. and Taniguchi, S. (1991) Isoforms of retinoic acid receptor β expressed in the chicken embryo. *Biochim Biophys Acta* 1089, 273-275.
- Noji, S., Nohno, T., Koyama, E., Muto, K., Ohshima, K., Aoki, Y., Tamura, K., Ohsugi, K., Ide, H., Taniguchi, S. and Saito, T. (1991) Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature* 350, 83-86.
- Pankratz, M. J., Busch, M., Hoch, M., Seifert, E. and Jackle, H. (1992) Spatial control of the gap gene knirps in the *Drosophila* embryo by posterior morphogen system. *Science* 255, 986-989.

- Perlmann, T., Rangarajan, P. N., Umesono, K. and Evans, R. M. (1993) Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev* 7, 1411-1422.
- Petkovich, M. B., N. J., Krust, A. and Chambon, P. (1987) A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330, 444-450.
- Rehemtulla, A., Warwar, R., Kumar, R., Ji, X., Zack, D. J. and Swaroop, A. (1996) The basic motif-leucine zipper transcription factor Nrl can positively regulate rhodopsin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 191-195.
- Reynolds, K., Mezey, E. and Zimmer, A. (1991) Activity of the β -retinoic acid receptor promoter in transgenic mice. *Mech Dev* 36, 15-29.
- Reynolds, K., Zimmer, A. M. and Zimmer, A. (1996) Regulation of RAR β 2 mRNA expression: Evidence for an inhibitory peptide encoded in the 5'-untranslated region. *J Cell Biol* 134, 827-835.
- Rowe, A., Richman, J. M. and Brickell, P. M. (1991) Retinoic acid treatment alters the distribution of retinoic acid receptor- β transcripts in the embryonic chick face. *Development* 111, 1007-1016.
- Rowe, A., Richman, J. M. and Brickell, P. M. (1992) Development of the spatial pattern of retinoic acid receptor- β transcripts in embryonic chick facial primordia. *Development* 114, 805-813.
- Rutledge, J. C., Shourbaji, A. G., Hughes, L. A., Polifka, J. E., Cruz, Y. P., Bishop, J. B. and Generoso, W. M. (1994) Limb and lower-body duplications induced by retinoic acid in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5436- 5440.
- Ryan, G., Steele-Perkins, V., Morris, J. F., Rauscher III, F. J. and Dressler, G. R. (1995) Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development* 121, 867-875.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed.) (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Sanyanusin, P., Schimmenti, L. A., McNoe, L. A., Ward, T. A., Pierpont, M. E., Sullivan, M. J., Dobyns, W. B. and Eccles, M. R. (1995) Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux [published erratum appears in *Nat Genet* 1996 May;13(1):129]. *Nat Genet* 9, 358-364.
- Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H. and Vennstrom, B. (1986) The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324, 635-640.
- Shen, S., Kruyt, F. A. E., Hertog, J. D. and van der Saag, P. T. (1991) Mouse and human retinoic acid receptor β promoters: sequence comparison and localization of retinoic acid responsiveness. *DNA Sequence* 2, 111-119.
- Shenefelt, R. E. (1972) Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology* 5, 103-118.
- Smith, S. M. and Eichele, G. (1991) Temporal and regional differences in the expression pattern of distinct retinoic acid receptor- β transcripts in the chick embryo. *Development* 111, 245-252.
- Smith, S. M. (1994) Retinoic acid receptor isoform β 2 is an early marker for alimentary tract and central nervous system positional specification in the chicken. *Dev Dyn* 200, 14-25.
- Smith, S. M., Kirstein, I. J., Wang, Z. S., Fallon, J. F., Kelley, J. and Bradshaw-Rouse, J. (1995) Differential

expression of retinoic acid receptor- β isoforms during chick limb ontogeny. *Dev Dyn* 202, 54-66.

Sporn, M. B., Roberts, A. B. and Goodman, D. S. (1994) *The retinoids; biology, chemistry, and medicine* (New York: Raven Press).

Steingrimsson, E., Pignoni, F., Liaw, G. J. and Lengyel, J. A. (1991) Dual role of the *Drosophila* pattern gene *tailless* in embryonic termini. *Science* 254, 418-421.

Stiemke, M. M., Landers, R. A., al-Ubaidi, M. R., Rayborn, M. E. and Hollyfield, J. G. (1994) Photoreceptor outer segment development in *Xenopus laevis*: influence of the pigment epithelium. *Dev Biol* 162, 169-180.

Strickland, S. and Mahdavi, V. (1978) The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* 15, 393-403.

Sucov, H. M., Murakami, K. K. and Evans, R. M. (1990) Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type β gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5392-5396.

Swain, P. K., Chen, S., Wang, Q. L., Affatigato, L. M., Coats, C. L., Brady, K. D., Fishman, G. A., Jacobson, S. G., Swaroop, A., Stone, E., Sieving, P. A. and Zack, D. J. (1997) Mutations in the cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration. *Neuron* 19, 1329-1336.

Swaroop, A., Xu, J. Z., Pawar, H., Jackson, A., Skolnick, C. and Agarwal, N. (1992) A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 266-270.

Thaller, C. and Eichele, G. (1987) Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* 327, 625-628.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

Tickle, C., Alberts, B., Wolpert, L. and Lee, J. (1982) Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* 296, 564-566.

Tsai, S. Y. and Tsai, M.-J. (1997) Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): Coming of age. *Endocrine Rev* 18, 229-240.

Umesono, K., Giguere, V., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M. (1988) Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* 336, 262-265.

Umesono, K. and Evans, R. M. (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139-1146.

Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C. and Evans, R. M. (1991) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors. *Cell* 65, 1255-1266.

Vivanco-Ruiz, M. M., Bugge, T. H., Hirschmann, P. and Stunnenberg, H. G. (1991) Functional characterization of a natural retinoic acid responsive element. *EMBO J* 10, 3829-3838.

Wanek, N., Gardiner, D. M., Muneoka, K. and Bryant, S. V. (1991) Conversion by retinoic acid of anterior cells into

ZPA cells in the chick wing bud. *Nature* 350, 81-83.

Watanabe, T. and Raff, M. C. (1992) Diffusible rod-promoting signals in the developing rat retina. *Development* 114, 899-906.

Weinberger, C., Thompson, C. C., Ong, E. S., Lebo, R., Gruol, D. J. and Evans, R. M. (1986) The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324, 641-646.

Wilson, T. E., Paulsen, R. E., Padgett, K. A. and Milbrandt, J. (1992) Participation of Non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science* 256, 107-110.

Wolpert, L. (1969) Positional information and the spatial pattern of cellular formation. *J Theoret Biol* 25, 1-47.

Wright, A. F. (1997) A searchlight through the fog. *Nat Genet* 17, 132-134.

Yao, T. P., Forman, B. M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J. D., McKeown, M., Cherbas, P. and Evans, R. M. (1993) Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 366, 476-479.

Yu, R. T., McKeown, M., Evans, R. M. and Umesono, K. (1994) Relationship between *Drosophila* gap gene *tailless* and a vertebrate nuclear receptor Tlx. *Nature* 370, 375-379.

Zelent, A., Mendelsohn, C., Kastner, P., Krust, A., Garnier, J. M., Ruffenach, F., Leroy, P. and Chambon, P. (1991) Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor β are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J* 10, 71-81.

Zimmer, A. and Zimmer, A. (1992) Induction of a RAR β 2-lacZ transgene by retinoic acid reflects the neuromeric organization of the central nervous system. *Development* 116, 977-983.

梅園和彦 (1996) 核内レセプターを介するホルモン/ビタミンシグナルの伝達機構；蛋白質 核酸 酵素, 41(8), 1265-1272

梅園和彦 (1998) 核内レセプタースーパーファミリー；最新医学, 53(3), 350-357

梅園和彦 (1998) オーファンレセプターの機能解析；実験医学, 16(19), 2431-2435

加藤茂明 (1994) 「核内レセプターと情報伝達」 羊土社

加藤茂明 (1998) 核内レセプター研究 '98；実験医学, 16(19), 2426-2430

小林未明、梅園和彦 (1998) レチノイン酸受容体と疾患の関連；最新医学, 53(3), 368-374

日本ビタミン学会編 (1989) 「脂溶性ビタミン」 化学同人

野崎健介 (1996) 国立奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科修士論文

橋本祐一、首藤紘一編 (1992) 「レチノイド」 講談社サイエンティフィク

原 健二、梅園和彦 (1998) 核内レセプタースーパーファミリー；医学のあゆみ, 186, 649-655