

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	佐貫 理佳子
論文題目	<i>Panky</i>, a novel photoreceptor-specific ankyrin repeat protein, is a transcriptional cofactor that suppresses CRX-regulated photoreceptor genes. (新規視細胞特異的アンキリンリピート蛋白質 <i>Panky</i> はCRX によって転写調節を受ける視細胞遺伝子群の発現を抑制する転写コファクターである)		
(論文内容の要旨)			
網膜は 6 種類の神経細胞と 1 種類のミューラー細胞からなる中枢神経系由来の組織である。網膜の最外層に光を受容する視細胞が位置する。視細胞の発生や分化、および成熟にはホメオボックスドメインを持つ転写因子の <i>Crx</i> や <i>Otx2</i> が必須の役割を果たしている。<i>Crx</i> のノックアウト (KO) マウスの網膜では、視細胞の運命決定は行われるが終末分化が起こらない。<i>Crx</i> の上流因子である <i>Otx2</i> の視細胞特異的コンディショナルノックアウト (CKO) マウスでは、視細胞前駆細胞がアマクリン様細胞に細胞運命転換する。<i>Panky</i> は <i>Otx2</i> CKO マウス網膜の遺伝子プロファイルを野生型と比較した解析において、その発現が <i>Otx2</i> CKO において著しく低下している遺伝子の一つとして同定された。<i>Panky</i> の発現は網膜視細胞と松果体特異的であり、アンキリンリピートを有する構造から、<i>Panky</i> (<i>photoreceptor-specific ankyrin repeat protein</i>) として登録された。本研究は網膜視細胞に発現する新規アンキリンリピート蛋白質遺伝子 <i>Panky</i> の同定、発現調節機構および機能解析を行うことを目的とした。 生後 12 日目の <i>Otx2</i> CKO 網膜とコントロール網膜由来の cDNA を用いて定量的 PCR を行ったところ、<i>Otx2</i> CKO マウスにおいて <i>Panky</i> の発現はほぼ消失していた。ノザン解析と RT-PCR によって <i>Panky</i> は網膜と松果体での特異的発現することが認められた。切片 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションによって網膜における発現パターンを調べると、<i>Panky</i> は生後 1 日目付近から視細胞に発現し、9 日目で最も強い発現が見られ、成体マウスでも発現が維持されていることが明らかとなった。錐体視細胞由来細胞株 661W に強制発現させた PANKY の細胞内局は細胞質と核であった。<i>Panky</i> の発現調節を調べるために、<i>Crx</i> KO マウスで切片 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションおよびノザン解析を行った。<i>Crx</i> KO マウスでは網膜、松果体共に <i>Panky</i> の発現は認められなかった。ルシフェラーゼ解析から、約 2.3kb の <i>Panky</i> プロモーターは CRX により直接活性化されることが明らかとなった。また <i>in vivo</i> エレクトロポレーション法によって <i>Panky</i> のプロモーターは生体でも視細胞特異的な発現を担うことが示された。PANKY は視細胞における転写制御に関わると推測されたため、CRX によって活性化される遺伝子のプロモーターを用い、CRX の転写制御活性に対する PANKY の影響を検定した。PANKY は CRX による転写活性化を抑制する機能を有することが明らかとなり、抑制性の転写コファクターであることが強く示唆された。PANKY と CRX との蛋白質相互作用は認められなかったが、ゲルシフト分析によって CRX に対しての PANKY 蛋白質の作用を解析した結果、CRX のターゲット配列に対する結合を抑制することを見いだした。 以上、網膜視細胞の発生途中から成熟期にかけて強く発現するアンキリンリピート蛋白質 <i>Panky</i> を同定した。さらに、PANKY は視細胞終末分化を司る転写因子 CRX の抑制的転写コファクターとして機能することを明らかにした。この研究は、網膜視細胞をモデルとして細胞特異的な転写制御のメカニズムの理解に貢献すると考えられる。			

(論文審査の結果の要旨)			
本研究は、網膜の視細胞の分化・発生および維持の分子機構を明らかにする目的で、網膜特異的な発現をする新規遺伝子 <i>Panky</i> を同定し、その発現様式、調節メカニズムおよび機能解明を分子生物学的・組織学的および細胞生物学的手法を用いて行ったものである。本論文より <i>Panky</i> は網膜視細胞に高発現する遺伝子であることが明らかにされた。網膜視細胞の発生ならびに維持にはホメオボックス蛋白質、bHLH 蛋白質および核内受容体など、様々な転写因子が互いに関連しながら機能している。そのなかで <i>Panky</i> は、転写因子 <i>Otx2</i> の下流遺伝子で網膜色素変性症の原因遺伝子である転写因子 <i>Crx</i> によって発現調節されることが示された。また PANKY は CRX によって活性化される遺伝子発現を抑制する機能を有することが明らかにされた。光受容蛋白質であるオプシンを網膜視細胞で過剰発現させたマウスは網膜変性を引き起こすことが知られており、生体にはこれら光受容体遺伝子群の転写活性を微調節するメカニズムが備わっていると考えられる。従って PANKY は視細胞で発現する遺伝子群の調節を担う抑制因子であると考えられる。 以上の研究は網膜視細胞遺伝子群の転写制御メカニズムの解明に貢献し中枢神経系の発生と機能維持の理解に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 2 2 年 2 月 9 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			