

# 論文の内容の要旨

## Transcriptional regulation of gene expressions in middle wavelengths-sensitive cone photoreceptors of zebrafish

(ゼブラフィッシュにおいて中波長領域感受性を示す  
錐体の遺伝子発現制御)

小川 洋平

脊椎動物の視細胞は2種類に大別される。これら2種類の光感受性細胞はその形態により桿体・錐体と呼ばれ、両者はそれぞれ薄明視と昼間視という異なる視覚機能を担う。なかでも、互いに異なる波長感受性の錐体サブタイプが存在すると色覚が生じる。2種類以上の錐体タイプの光受容タンパク質（錐体オプシン）がそれぞれ異なる錐体細胞に発現し、色弁別を担う。これらオプシンの発現や視細胞の分化・成熟を制御する転写因子群は、主にマウスを用いた解析から同定され、視細胞のアイデンティティを構築・維持する転写ネットワークが提唱されている（Swaroop *et al.*, 2010, *Nature reviews Neurosci.*）。しかし、マウスの錐体サブタイプの種類は他種の脊椎動物に比べて限られているので、脊椎動物に広く保存されている錐体サブタイプそれぞれの分化や錐体オプシンの発現制御メカニズムを、マウスを用いた研究から全て説明することはできない。マウスを含め多くの哺乳類は中波長領域感受性の2種類の錐体オプシンである青色感受性と緑色感受性の錐体オプシンを進化の過程で失っている（図1）。さらに、円口類であるフクロヤツメを用いた解析から、脊椎動物の祖先種において4種類（UV, Blue, Green, Red）の錐体オプシンがゲノムにコードされていたと考えられており（Collin *et al.*, 2003, *Curr. Biol.*）、分子の系統解析により脊椎動

物が保持する錐体オプシンはすべてこの4種類に分類される（図1）。そこで、私は4種類すべての錐体オプシンを持つゼブラフィッシュを対象として、視細胞の分化・成熟を担う転写因子の同定を試みた。

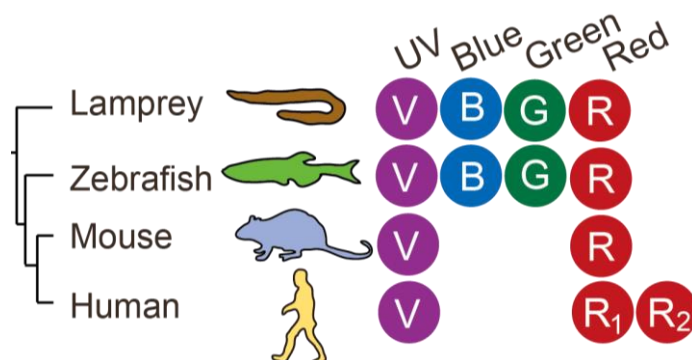


図1: それぞれの脊椎動物が持つ錐体オプシン  
同じ色にて示された遺伝子はオルソログである

当研究室の先行研究においては、ゼブラフィッシュの桿体と錐体を分取してマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行い、桿体と錐体との間で発現量が大きく異なる遺伝子を網羅的に同定した（白木ら、未発表）。本研究では、錐体に特異的に発現すると判定された転写因子の発現組織や発現時期を、RT-qPCR法により解析し、さらに眼球切片を用いた *in situ* hybridization により、詳細な発現部位を解析した。その結果、*sine oculis homeobox homolog 7 (six7)* が幼生・成魚を問わず錐体のみ  
に特異的に発現することを明らかにした。次に、*six7* が錐体の分化や成熟に寄与する可能性を検証するため、TAL effector nucleases (TALENs) を用いて *six7* ノックアウトゼブラフィッシュ (*six7* KO) を作製した。眼球由来 RNA を用いた RT-qPCR により、光シグナリング関連遺伝子の発現量を調べると共に、網膜内における錐体オプシンの発現分布を *in situ* hybridization 法により解析した。その結果、幼生期の *six7* KO において緑色感受性のオプシンを発現する錐体細胞数が著しく減少していることが判明した。さらに、*six7* KO の成魚においても緑色感受性のオプシンを発現する視細胞は著しく減少していることが分かった。以上の実験結果から、緑色感受性のオプシンを発現する緑錐体の分化や成熟、またはその両方に *six7* が必要であることが明らかになった。

幼生期の *six7* KO では緑色感受性の錐体の顕著な減少だけではなく、青色感受性オプシンの発現細胞数も約半分に減少する。これより、*six7* と近縁な分子が青色感受性の錐体の分化・成熟を制御するという仮説をたて、候補となる転写因子の絞りこみを行った。当研究室のマイクロアレイ解析により、真骨類特異的なゲノム重複により生じた2つの転写因子 *sine oculis homeobox homolog 6a* (*six6a*) と *sine oculis homeobox homolog 6b* (*six6b*) が、*six7* と同じく桿体に比べて錐体に強く発現することが判明した。また *in situ* hybridization により発現分布を調べたところ、*six6b* は錐体細胞やアマクリン細胞、そしてガングリオン細胞に強く発現することが判明した。次に、TALENs を用いて *six6a*, *six6b* ノックアウトゼブラフィッシュをそれぞれ作成し、眼球由来 RNA を用いた RT-qPCR により機能解析を行った。その結果、*six6a*, *six6b* の二重欠損ゼブラフィッシュにおいては、錐体オプシンや桿体オプシンの発現量は野生型と比べて有意な差は確認されなかった。そこでさらに、この変異をもつ個体と *six7* 変異体とを掛け合わせて *six6a*, *six6b*, *six7* 三重欠損ゼブラフィッシュを作成して機能解析を行った。その結果、三重欠損個体において青色感受性オプシンの発現細胞が顕著に減少し、これら転写因子による相補的な青色感受性錐体の分化・維持機構が存在することを明らかにした。

*six7* 遺伝子は条鰭類において保存されており、また現在まで他の脊椎動物種において確認されていない。一方、*six6* 遺伝子はほぼすべての脊椎動物に保存されている。以上の遺伝子の保存関係より、条鰭類以外の脊椎動物においては *six6* がこれら2種類の中波長領域感受性の錐体オプシン両方を制御するのではないかと予想した。そこで、*six6b* を視細胞前駆細胞に過剰発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作成し、さらに *six7* 変異体と掛け合わせ、*six7* KO ゼブラフィッシュにおける *six6b* 過剰発現の効果を検証した。その結果、*six6b* の過剰発現によって青色・緑色感受性オプシンの発現量がともに有意に上昇した。一方、*six7* 野生型に *six6b* を過剰発現すると、錐体オプシンや桿体オプシンの発現量に有意な変化は確認されなかった。以上の結果から、ゼブラフィッシュ *six6b* と *six7* はともに中波長領域感受性の2種類のオプシンの遺伝子発現に必須の遺伝子であると結論し、また条鰭類以外の脊椎動物においては *six6* が2種類の中波長領域感受性の錐体オプシン両方を制御する可能性が示唆された。