

審査の結果の要旨

氏名 趙 晶

本研究は神経網膜細胞分化過程において重要な役割を演じていると考えられる外因的シグナルの受容による増殖制御、形態制御を明らかにするため、前駆細胞における細胞表面分子環境をプロテオミクス技術を用いたマウス胎生期と成体網膜細胞における膜タンパク質の網羅的発現プロファイルの作成から明らかにし、発現プロファイルから得られた分子の網膜発生過程における機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. nanoflow LC-MS/MS を用い、マウス胎生 17 日目、成体マウス網膜から調整した膜タンパク質分画における全膜タンパク質の網羅的発現プロファイルを作成し、RT-PCR を用いた発現解析を行って網膜発生と相関がある分子として MARCKS-like protein (MLP) , Glycoprotein m6a を同定した。
2. マウス網膜発生過程における MLP の発現パターンを *in situ hybridization* を用いて発現解析を行った結果、発生期網膜前駆細胞、神経節細胞における発現が認められた。一方、Glycoprotein M6a に対して免疫染色を用いて発現解析を行った結果、発生期網膜において神経節、アマクリン細胞の神経突起で強い発現が認められた。
3. MARCKS-like protein の機能解析を胎生 17 日目マウス網膜体外培養系にレトロウイルスを用いて前駆細胞特異的に過剰発現させることにて行った。その結果、遺伝子導入細胞の各網膜細胞層における局在、網膜細胞分化には影響を与える前駆細胞の増殖を促進することが示された。膜遊離型の non-myristylation 型、恒常的リン酸化型、膜局在型の非リン酸化型 MLP 変異体を作成し、

胎生 17 日目マウス網膜体外培養系に導入し増殖に対する影響を解析した結果、恒常的リン酸化型、non-myristylation 型 MLP 変異体では増殖を促進できないことが示され、細胞膜に局在する MLP が網膜前駆細胞の増殖促進に関与することが考えられた。

4. Glycoprotein M6a の機能解析を胎生 17 日目マウス網膜体外培養系にレトロウイルスを用いて前駆細胞特異的に過剰発現させることにて行った。その結果、遺伝子導入細胞の各網膜細胞層における局在、網膜細胞分化には影響を与える前駆細胞の増殖を一過性に促進することが示された。

5. マウス網膜再凝集培養法を用いた神経突起の解析から Glycoprotein M6a の過剰発現により神経突起の伸展が促進されることが示され、Glycoprotein M6a は前駆細胞の増殖を一過性に促進するものの神経突起の伸展に重要な役割を持つ分子であることが考えられた。

以上、本論文はプロテオミクス技術を用いたマウス胎生期、成体網膜における膜タンパク質の網羅的解析から効率的に新規機能タンパク質を同定し、同定した 2 つの膜タンパク質 MLP、Glycoprotein M6a は網膜発生過程において細胞増殖、神経突起の伸展において重要な役割を担っていることを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、神経網膜細胞分化過程における外因的シグナルの受容の場としての細胞表面分子環境の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。