

論文の内容の要旨

論文題目 Cloning and characterization of *mr-s*, novel SAM domain protein, predominantly expressed in retinal photoreceptor cells

(網膜視細胞特異的に発現する新規遺伝子 *mr-s* のクローニングと機能解析)

指導教官 新家 眞 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

井上達也

個体発生の際、組織特異的に発現する遺伝子はしばしば細胞のアイデンティティーを決める重要な役割を担う。網膜視細胞特異的に発現する遺伝子はこれまで数多く報告されているが、これらのなかにも発生期の網膜において重要な役割を担うものが存在する。我々は、NCBI (National Center for Biotechnology Information)の Digital Differential Display を用いて、網膜視細胞特異的に発現する遺伝子のスクリーニングをおこない、これらのなかから新規遺伝子 *mr-s* (major retinal SAM domain protein)を単離した。*mr-s*は、C末端に SAM (sterile alpha motif) domain をもつ全長 542 アミノ酸からなるタンパク質をコードしている。また、*mr-s* 遺伝子はヒトからゼブラフィッシュにいたる脊椎動物で進化的に保存されている。網膜発生の分子メカニズムがよく保存されているこれらの種間で *mr-s* が存在することから、*mr-s* 遺伝子が視細胞の発生において重要な機能を果たすと考えられた。*mr-s* タンパク質は SAM domain 以外に既知のドメイン構造を持たないため、我々は SAM domain をもつ他のタンパク質の SAM domain のアミノ酸配列と *mr-s* タンパク質の SAM domain のアミノ酸配列を比較した。この結果、*mr-s* の SAM domain は、polyhomeotic や TEL といった転写因子の SAM domain と配列が似ていること

が明らかになった。このことから *mr-s* タンパク質が転写制御に関わる分子である事が推測された。*mr-s* の遺伝子発現を調べるために行った *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、*mr-s* は胎生 18 日目頃より網膜の外層に発現しはじめ、出生後 3 日目から 6 日目の網膜視細胞に特に強い発現がみられた。この時期は、網膜視細胞の終末分化が起きることが知られており、*mr-s* が視細胞の発生、特に終末分化に重要である可能性が示唆される。さらに我々はノザンブロットあるいは RT-PCR により、*mr-s* が網膜特異的に発現することを確認した。

SAM domain はタンパク質相互作用に関わることが知られており、実際に polyhomeotic や TEL は SAM domain を介してポリマーを形成して機能することが報告されている。*mr-s* の SAM domain がタンパク質相互作用に関わっているかどうかを調べるために、我々は全長 *mr-s* を用いて Yeast two-hybrid スクリーニングを行った。28 個のポジティブクローンのうち、5 個は SAM domain を含む *mr-s* の cDNA であった。さらに、*mr-s* タンパク質同士の結合を確かめるため、免疫沈降法を行った。HEK293T 細胞において、*mr-s* タンパク質同士が相互作用し、その結合は主として SAM domain を介した結合であった。これらの結果から、*mr-s* タンパク質が、polyhomeotic や TEL といった転写制御に関わる分子と同様に、SAM domain を介して *mr-s* タンパク質同士で結合していることが示唆された。

さらに、われわれは *mr-s* タンパク質が実際に転写活性を持つかどうかをルシフェラーゼアッセイによって検討した。その結果、Yeast の転写因子である GAL4 の DNA 結合領域を融合させた *mr-s* タンパク質は転写抑制活性をもち、さらに *mr-s* の転写抑制には C 末端領域の 80 アミノ酸が必要である事を明らかにした。

本研究において、われわれは網膜視細胞に特異的に発現する遺伝子 *mr-s* を単離した。*mr-s* は出生直後の網膜視細胞で強い発現がみられる。*mr-s* タンパク質は C 末端領域に SAM domain をもつが、これは既に報告されている polyhomeotic や TEL といった転写制御に関わる分子の SAM domain と相同性が高い。また、*mr-s* タンパク質は、主として SAM domain を介した自己結合能をもち、ルシフェラーゼアッセイの結果から転写抑制活性をもつ事が明らかとなった。これらの結果から、*mr-s* 遺伝子が網膜発生期において転写制御因子として重要な役割を担う事が示唆された。