

## 審査の結果の要旨

井上 達也

本研究は、網膜視細胞の発生期に視細胞特異的に発現する新規遺伝子 **mr-s** (major retinal SAM domain-containing protein)のクローニングと機能解析をおこなったものであり、下記の結果を得ている。

1. NCBI の Digital Differential Display を用いて、マウス網膜に特異的に発現する EST 断片をスクリーニングした。これらのなかから、*in situ* ハイブリダイゼーションにて視細胞に発現を認めるものを選び、マウス網膜の cDNA ライブラリーを用い、ライブラリースクリーニングによって全長 cDNA を得た。**mr-s** の全長 cDNA は 2250 塩基で、542 アミノ酸からなり、C 末端に SAM domain をもつタンパク質をコードしていた。
2. **mr-s** タンパク質は、ゼブラフィッシュからヒトまで保存されており、このことから **mr-s** が網膜視細胞の発生に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。**mr-s** タンパク質の C 末端に存在する SAM (sterile alpha motif) domain は、タンパク質相互作用に関わるドメインとされており、現在 300 を超えるタンパク質で報告されている。**mr-s** の SAM domain のアミノ酸配列を他の SAM domain を含むタンパク質と系統樹解析によって比較したところ、**mr-s** の SAM domain は転写制御に関わる分子として知られている polyhomeotic や TEL の SAM domain と相同性が高く、**mr-s** が転写制御に関わる分子である可能性が示唆された。
3. **mr-s** は、網膜視細胞に特異的に発現する。*In situ* ハイブリダイゼーションの結果、**mr-s** の発現はマウスでは胎生 18 日頃より網膜外層に認められ、生後 6 日前後にピークとなる。この時期は視細胞の終末分化する時期であり、**mr-s** が視細胞の終末分化に何らかの機能を果たしている可能性が示唆される。Northern blot あるいは RT-PCR にても **mr-s** が網膜に特異的な遺伝子であることが明らかとなった。
4. さらに **mr-s** の転写が網膜視細胞の発生に必須のホメオボックス **Crx**

に直接制御をうけていることをルシフェラーゼアッセイを用いて明らかにした。**mr-s** の転写開始点の上流 1.2kbp のプロモーター領域をルシフェラーゼにつないだものをレポーターとして、**Crx** を **HEK293T** 細胞に共発現した場合、コントロールに比べて有意に転写活性が上昇した。また、この領域に含まれる 3カ所の **Crx** 結合モチーフに変異を起こしたレポーターでは転写活性の上昇が認められなかった。この結果から、**mr-s** は **Crx** の直接制御を受ける遺伝子であると結論づけた。

5. **SAM domain** はタンパク質相互作用に関わるドメインとして知られており、また **polyhomeotic** や **TEL** といった転写因子は **SAM domain** を介して自己結合することが知られている。実際、**yeast two-hybrid screening** や免疫沈降法により、**mr-s** が **SAM domain** を介して自己結合することが明らかとなった。また、**HEK293T** 細胞に強制発現した **mr-s** を免疫染色すると細胞内でも主として核内に局在が認められた。以上のことから **mr-s** タンパク質が、**polyhomeotic** や **TEL** と同様に転写因子として働いている可能性が示唆された。
6. また、**mr-s** タンパク質が転写因子の性質を持つかどうかを検討するため、酵母の転写因子である **GAL4** の DNA 結合ドメインと **mr-s** が融合したタンパク質を **HEK293T** 細胞に発現させて、**GAL4** の結合する DNA 配列にルシフェラーゼをつなげたレポーターに対する影響を検討した。その結果、この融合タンパク質は、ルシフェラーゼの転写を抑制した。さらに、**mr-s** タンパク質の転写抑制活性は、**SAM domain** よりもさらに C 末端の 80 アミノ酸に存在した。この領域は、**mr-s** のなかでも種間で比較的良好に保存されており、重要な役割を担う可能性があると考えられた。

以上、本論文では網膜視細胞の発生期に特異的に発現する遺伝子 **mr-s** のクローニングと機能解析をおこなった。本研究は網膜発生の詳細を理解する上で重要な貢献をなすと考えられる。また、**SAM domain** を持つ転写因子はこれまでいくつか報告があるが、これらの転写制御のメカニズムはいまだ明らかになっていない。本研究で **mr-s** の分子機能を明らかにすることによって、他の **SAM domain** を含む転写因子の分子メカニズム解明にもつながることが期待される。よって、本研究は、学位の授与に値するものと考えられる。