

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 馬場 行広

本研究はマウス網膜発生過程における zinc-finger 型たんぱく質 Sall3 の機能を解析するため、Sall3 ノックアウトマウスの網膜での表現型解析、あるいは遺伝子過剰発現実験にて Sall3 によって発現誘導ないし抑制される分子の解析を行い、下記の結果を得ている。

1. Sall3<sup>+lacZ</sup> の発生段階での網膜において、lacZ と水平細胞マーカーNF160 の免疫組織化学染色を行ったところ、胎生 15 日 (E15) から生後 (P8) にかけて NF160 陽性細胞が lacZ を発現していることが確認され、未熟および成熟水平細胞が Sall3 を発現していることが示された。

2. Sall3<sup>-/-</sup>マウスの分化初期の E17.5 および P0 の網膜において、水平細胞マーカーである NF160、NF68、calbindin、Pax6、および Prox1 の免疫組織化学染色を行ったところ、それぞれのマーカーの発現が見られ、さらに Pax6 および Prox1 陽性の水平細胞の数をカウントした結果では、Sall3<sup>-/-</sup>とコントロールで有意な差は見られなかったことから、Sall3 は水平細胞の細胞運命決定には関与しないことが示された。一方、水平細胞の NF160、NF68、および calbindin の発現レベルを Sall3<sup>-/-</sup>とコントロールで比較した場合、Sall3<sup>-/-</sup>水平細胞でそれぞれのマーカーの発現が低下していることが観察された。

3. Sall3<sup>-/-</sup>マウスの分化後期の網膜において、水平細胞マーカーである NF160、および calbindin の免疫組織化学染色を行ったところ、Sall3<sup>-/-</sup>で水平細胞の外網状層への神経突起伸長の消失、NF160 の発現の消失、および外網状層の形成不全が観察された。また、Sall3<sup>-/-</sup>でミュラーグリア細胞マーカーである GS の発現が低下していた。

4. 全網膜から RNA を抽出し、RT-PCR の解析を行ったところ、分化後期の Sall3<sup>-/-</sup>

の網膜において、水平細胞マーカーである NF160、NF68、Lim1、および CX57 の発現レベルがコントロールに比べて低下していることが示された。

5. E17.5 の網膜にレトロウイルスを用いて Sall3 あるいはバリエーション型の Sall3v を過剰発現し、網膜体外培養法にて 2 週間培養し、免疫組織化学染色を行ったところ、感染細胞に占める視細胞マーカー PNR 陽性細胞の割合の減少、GS 陽性細胞の割合の増加、および NF160 陽性細胞の割合の増加が示された。また、遺伝子過剰発現後に BrdU を取り込ませて細胞増殖能の解析を行ったところ、Sall3 および Sall3v はコントロールと有意な差は認められなかった。Sall3 過剰発現実験を単層培養法を用いて解析したところ、Sall3 過剰発現細胞に占める NF160 陽性細胞の割合が、コントロールよりも有意に増加していることが示された。

以上、本論文はマウス網膜において、Sall3 ノックアウトマウスの解析から、Sall3 は水平細胞での NF160 および NF68 の発現レベルの維持に必要であること、さらに水平細胞の外網状層への神経突起伸長に必要な分子であることを明らかにした。また、Sall3 過剰発現実験の解析から、Sall3 が NF160 の発現に関わることを示した。本研究は、これまで明らかにされていなかった水平細胞の最終分化における分子メカニズムの解明に新知見を与えるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。