The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular Cloning of a Novel Membrane Glycoprotein, Pal, Specifically Expressed in Photoreceptor Cells of the Retina and Containing Leucine-Rich Repeat
Author(s)	五味, 文
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3184132
rights	Copyright: Society for Neuroscience
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	五味　文（ごみ　ふみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　16105　号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Molecular Cloning of a Novel Membrane Glycoprotein, Pal, Specifically Expressed in Photoreceptor Cells of the Retina and Containing Leucine-Rich Repeat （ロイシンリッチリピートをもつ新規網膜視細胞特異的遺伝子 Pal のクローニング）
論文審査委員	（主査） 教授　田野　保雄 （副査） 教授　遠山　正彌　　教授　不二門　尚

論文内容の要旨

【研究の目的】

網膜に特異的に発現のみられる分子は、視覚生理や網膜の構造形成といった網膜特有の機構に関与している可能性が高く、このような網膜特異的遺伝子を抽出し機能解析を行うことで、網膜特有の機能を分子生物学的に理解することが可能となる。さらに、このような網膜特異的遺伝子は、網膜の遺伝性疾患の病因遺伝子である可能性もあり、新規の網膜特異的遺伝子を単離し、その機能を解析していくことは、意義のあることと考えられる。

今回我々は、視覚にかかわる新規遺伝子の単離と機能解析を目的に、特にげっ歯類では出生後2週間をかけて網膜の層分化が完成し、それに伴って視覚も発達することに注目し、ラット網膜において出生直後には発現はなく、生後2週で発現がみられるようになる遺伝子の抽出を試みた。

【方法ならびに結果】

出生直後及び生後2週のラット網膜からRNAを抽出してcDNAを作成し、differential display法を用いて、出生直後にはなく、生後2週でのみ発現がみられる遺伝子断片を選択した。これらの遺伝子断片の1つは新規遺伝子であると考えられ、ライブラリースクリーニングにより遺伝子の全長を取得した結果、この遺伝子は、623アミノ酸からなる1回膜貫通型の糖蛋白質であることが推定された。細胞外ドメインと推測される部位には、ロイシンリッチリピート、免疫グロブリンC2、フィブロネクチンⅢの機能ドメインを有していた。

次にノザン法にてこの遺伝子の発現を、ラットの組織別、成長段階別に検討した結果、この遺伝子は網膜に特異的であり、生後1週頃から発現がみられ、生後2週以降恒常的に発現していた。

in situ hybridizationにてこの遺伝子の発現部位を検討した結果、生後1週頃より将来視細胞層になると考えられる外側網膜にシグナルを認め、生後2週、8週では分化の完成した網膜において、視細胞層及び視細胞内節で発現を認めた。

この遺伝子の翻訳産物である蛋白の局在を確認する目的でポリクローナル抗体を作成し免疫組織染色を行ったところ、シグナルは視細胞外節で強く認められた。細胞内での局在を確認するために、免疫電顕を行った結果、視細胞外節内の円板上にシグナルを認めた。これらの結果より、この新規遺伝子は視細胞外節円板に特異的であり、ロイシンリッチリピート等の機能ドメインを有することから、Pal（Photoreceptor associated leucine-rich repeat superfamily）と命名した。

Pal 蛋白の機能を推定する目的で、293T細胞に Pal 発現ベクターを導入し、蛋白を回収してウエスタンブロットを行うと、推定される分子量の約75kDa の位置以外に、約150kDa の位置にバンドを認めた。免疫沈降法にて確認した結果、Pal 蛋白は 2 量体を形成することがわかった。

近年、遺伝性網膜疾患である網膜色素変性症の遺伝子解析がすすめられてきており、これまでに約20種類の遺伝子がその病因遺伝子であることが報告されている。これらの遺伝子の約半数は視細胞特異的な遺伝子であり、視細胞外節に存在する Pal も、網膜疾患の発症に関与する可能性が考えられる。連鎖解析によって明らかになった網膜疾患の遺伝子座と、Pal 遺伝子の染色体上の位置との重なりを検討するために、まずラットの Pal 翻訳領域の配列をプローブとして、ヒトの Pal 遺伝子を取得し、さらに Pal のヒトのゲノムクローンを取得して FISH (fluorescence in situ hybridization) を行った。その結果、ヒト Pal 遺伝子は10q23.2－23.3に位置することが明らかになった。この部位は、網膜色素変性症の locus としての報告はないが、網膜色素変性と聾とを合併する Usher 症候群のlf及び ld 型の病因遺伝子が10番染色体にあると報告されていることから、これらの疾患との関わりが示唆された。

【総括】

ラット網膜視細胞特異的遺伝子 Pal を新規にクローニングした。この遺伝子は623アミノ酸からなる 1 回膜貫通型の糖蛋白質で、細胞外ドメインに、ロイシンリッチリピート、免疫グロブリンＣ２、フィブロネクチンⅢの機能ドメインを有していた。ラット網膜においては、生後 1 週頃から発現が見られ、成体においては恒常的に発現していた。免疫組織化学及び免疫電顕の結果から、この蛋白は視細胞外節円板上に存在していることが示された。さらにこの蛋白は、 2 量体を形成することが確認された。ヒトの Pal 遺伝子の染色体部位は10q23.2－23.3であることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

五味らは、新規の網膜特異的遺伝子 Pal をクローニングし、その発現解析や局在検討をおこなった。その結果、Pal 遺伝子は、ラットにおいて視覚が成立する生後 1 週頃より発現がみられはじめ、以後恒常的に発現していること、さらに免疫組織化学により、Pal 蛋白は視細胞外節の円板上に存在することが推定された。

網膜に特異的に発現のみられる分子は、視覚生理や網膜の構造形成といった、網膜特有の機構に関与している可能性が高く、さらに Pal の存在する視細胞外節は光トランスダクションの開始の場であることから、Pal が視機能に何らかの関与をしていることは十分考えられる。

以上より、新規網膜特異的遺伝子 Pal の発見と解析は、網膜の生理、機能を知る上で重要な手がかりとなるものであり、学位に値すると考える。