



Title	Isolation of a cDNA encoding a photoreceptor cell specific actin-bundling protein : retinal fascin
Author(s)	西信, 良嗣
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41638
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	西信良嗣
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14528号
学位授与年月日	平成11年3月25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	Isolation of a cDNA encoding a photoreceptor cell specific actin-bundling protein : retinal fascin (網膜視細胞特異的に発現するアクチン束化蛋白 retinal fascin の単離と機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 田野 保雄
	(副査) 教授 不二門 尚 教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

【目的】

網膜は神経系の中でも独立して分化した領域で、脳には存在しない網膜に特異的に発現する遺伝子が存在する。これらの網膜特異的遺伝子は、特に、視細胞に発現している場合が多く視覚の特殊な機能に関与していると考えられる。また、精神、運動等の脳の障害は示さず視覚障害のみをきたす網膜変性疾患等の遺伝子疾患が数多く存在している。これらの疾患の原因遺伝子は、網膜に特異的に発現している遺伝子の異常による可能性が高く、実際にロドプシンやcGMP phosphodiesterase 等の網膜特異的に発現する遺伝子の異常による網膜色素変性症が明らかにされている。このような疾患の解明のためには網膜特異的に発現する遺伝子の解析が不可欠と考え、網膜特異的に発現する新規の遺伝子を単離し解析することを試みた。

【方法ならびに成績】

ウシ網膜および脳 mRNA を用いた differential display 法、subtraction 法、ウシ網膜 cDNA library より無作為に選択したクローンの塩基配列の解析等によって、各々の方法から数個の候補遺伝子を得た。各々の候補遺伝子についてノーザンプロット法を行い眼にのみ特異的に発現しているクローンを選出した。そのクローンに対して *in situ* ハイブリダイゼーション法を行い、網膜特異的な発現を示すクローンを選択した。その結果ウシ網膜 cDNA library より actin bundling protein (アクチン束化蛋白) である fascin 遺伝子ファミリーと高い相同性を示す新規遺伝子を単離し、retinal fascin と名づけた。retinal fascin は492アミノ酸からなり、fascin 遺伝子ファミリー間で保存されている3つの共通領域を含有していた。*in situ* ハイブリダイゼーション法では網膜視細胞に限局した発現を認めた。機能解析をするためバキュロウイルス発現系を用いて組換え蛋白質を作成し、その生化学的性質を検討した。ニワトリの骨格筋より精製した F アクチンを使用し、actin-binding assay および actin-bundling assay を行った。その結果、retinal fascin がアクチン結合能、およびアクチン束化能を有することを証明した。rhodamine-phalloidin で標識した F アクチンを用いて蛍光顕微鏡で retinal fascin によって形成されたアクチン束を観察し、さらに電顕によってその詳細な構造を解析した。retinal fascin によって tight で compact なアクチン束が形成されていることを明らかにした。次に発生段階におけるこの遺伝子の発現を調べるために E20 (妊娠20日)、生後1日、生後1週、10日、2週、5週のラットの眼を使って *in situ* ハイブリダイゼーション法を行った。その結果、生後10日より retinal

fascin mRNA の発現を認めた。さらにヒトの病気との関連を調べるためにヒト網膜 cDNA library をスクリーニングし、2つの splicing variants を有するヒト retinal fascin cDNA を得た。次に FISH (fluorescent in situ hybridization) 法を用いて、遺伝子座を決定した。

【総括】

脊椎動物で現在までに構造が明らかになっているアクチン束化蛋白の fascin は、その分布が非常に幅広く多くの組織において発現しているため、全ての細胞の構造上で共通する部位で機能している可能性が考えられる。一方、今回単離を行った新規の網膜視細胞特異的なアクチン束化蛋白 retinal fascin は、今までに単離されている脊椎動物の fascin とは異なり、視細胞という特殊で複雑な形態を有する細胞にのみ限局して発現している。単一種類の細胞に特異的に発現しているアクチン束化蛋白を証明した最初の報告である。網膜での *in situ* ハイブリダイゼーション法の結果、視細胞層の機能的分化、発達につれて発現しているように思われた。視細胞の内節と外節を結ぶ結合部は結合線毛 (connecting cilium) とよばれるアクチンが豊富な特殊な構造を呈している。アクチン束化蛋白である retinal fascin はこの様に視細胞における特殊な形態の形成や維持に関係している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、網膜の視細胞にのみ特異的に発現している新規アクチン束化蛋白 retinal fascin の cDNA を単離し、さらにそのアクチン束形成機能について証明したものである。retinal fascin のアクチン束化機能は、視細胞の視覚受容のために必要となる特殊な形態の形成及び保持に深く関与しているものと考えられる。本研究で得られた知見は、視覚受容細胞の特殊な構造の成り立ちを理解する上で重要であるばかりでなく、網膜色素変性症などの網膜特異的疾患の原因の究明に貢献するものであり学位に値するものと認める。