



Title	Effects of NDRG1 family proteins on photoreceptor outer segment morphology in zebrafish
Author(s)	瀧田, 真平
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61491
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (瀧田 真平)	
論文題名	Effects of NDRG1 family proteins on photoreceptor outer segment morphology in zebrafish (ゼブラフィッシュにおけるNDRG1ファミリー蛋白質の視細胞外節の形態に対する影響)
論文内容の要旨 脊椎動物の網膜には桿体・錐体の2種類の視細胞が存在する。近年当研究室では、<i>N-myc downstream regulated gene 1b</i> (<i>ndrg1b</i>)遺伝子がコイ錐体特異的に発現していることを見出した。相同蛋白質であるヒトNDRG1蛋白質は常染色体劣性遺伝の脱ミエリン性神経変性の原因遺伝子として知られている。本研究では、NDRG1b蛋白質が錐体特異的にどのような機能に関わっているのかを明らかにすることを目的とし、コイと近縁で遺伝学的手法が確立したゼブラフィッシュを実験動物として用いて研究を行った。 <u>コイ<i>ndrg1b</i>のゼブラフィッシュ相同遺伝子の単離</u> 成魚でのRT-PCR解析により、ゼブラフィッシュ網膜には、<i>ndrg1b</i>遺伝子に加えて、N末端配列の異なる2種類のsplice variants, <i>ndrg1a-1</i>, 2遺伝子の合計3種類の遺伝子が発現していることが示唆された。そのため、これら3種類全ての遺伝子について蛋白質コード領域の全長をRT-PCRによりクローニングした。 <u>成魚視細胞での局在解析</u> 成魚網膜視細胞でのNDRG1a-1, NDRG1a-2, NDRG1b蛋白質の局在を検討する目的で、特異的抗体を作製し免疫組織染色を行った。その結果、NDRG1b蛋白質はコイ同様に錐体特異的に発現し、外節を含む形質膜に様に局在することが判明した。またNDRG1a-1蛋白質も錐体に発現し、NDRG1b蛋白質と同様の局在を示した。加えてNDRG1a-1は桿体にも発現しており錐体と似た局在を示したが、外節には局在しなかった。NDRG1a-2蛋白質は錐体のみで発現しており、軸索様突起に発現が見られた。視細胞では、光情報伝達に関わる蛋白質の多くが外節に局在する。従って、これら3種類の蛋白質は光情報伝達に直接に関与するのではなく、形態維持や脂質代謝など別の機能に関わる可能性が考えられる。 <u>初期発生過程での発現解析</u> 全身由来のtotal RNAを用いたRT-PCR解析により、初期発生過程におけるmRNA発現を検討した。その結果、視細胞の形成時期である受精後48時間(48 hpf)付近から<i>ndrg1a-1</i>と<i>ndrg1b</i>の発現が急激に亢進することが判明した。一方<i>ndrg1a-2</i>は、発生段階によらず未受精の段階からほぼ一定量発現していた。そして特異的抗体による免疫組織染色により、mRNA発現と対応して網膜でのNDRG1a-1・NDRG1b蛋白質の発現が48 hpf付近から観察された。しかし、NDRG1a-1が発現開始直後から視細胞層に限局して発現するのに対し、NDRG1bは最初視細胞層を含む網膜の広範囲で発現し、発生と共に視細胞層に限局していくことが判明した。網膜でのNDRG1a-2蛋白質の発現は明確には確認されなかった。 <u>視細胞の分化・成熟過程での錐体オプシン発現時期との比較</u> ゼブラフィッシュでは、一般に43-48 hpf付近に視細胞への最終分化が開始するため、48 hpf付近での視細胞層におけるNDRG1a・NDRG1b蛋白質の発現と視細胞のマーカーである錐体オプシンの発現の時期とを特異的抗体を使って比較した。先の発現解析より48 hpf付近ではNDRG1a-v2蛋白質の発現量は少ないと判断されたため、NDRG1a蛋白質の検出には、1と2を両方とも認識するC末端に対する抗血清を用いた。その結果、網膜層において72 hpfまでの全ての発生段階で、NDRG1a・NDRG1b陽性細胞は錐体オプシン陽性細胞よりも、より広範囲で観察された。この結果は、錐体が未成熟な分化直前ないしは直後の段階からNDRG1a・NDRG1b蛋白質は発現しており、また、視細胞層でオプシンに先行して発現が広がって行くことを強く示唆している。そのため、NDRG1a・NDRG1b蛋白質は錐体の成熟過程に何らかの寄与をする可能性がある。 <u>NDRG1a-1・NDRG1b蛋白質発現阻害の視細胞形成過程への影響</u> 視細胞におけるNDRG1a-1・NDRG1b蛋白質の機能を推定する目的で、受精直後の胚に<i>ndrg1a-1</i>または<i>ndrg1b</i>に対するMorpholinoアンチセンスオリゴ(MO)をインジェクションして簡便に発現阻害し、96 hpfにおいて眼球や網膜の免疫組	

組織学的な観察を行った。その結果、ランダムな配列であるcontrol MOを注入した個体に比べて、*ndrg1a-1*に対するMOを注入した個体では、桿体・錐体両視細胞の外節が顕著に縮小し、オプシン濃度が若干低下した。NDRG1bに対するMOを注入した個体では、control MOを注入した個体に比べて、錐体外節が顕著に縮小し、赤/緑オプシンの濃度が若干低下した。以上の結果から、NDRG1a-1, NDRG1b蛋白質は、ともに視細胞の外節形成に必要であることが示唆される。

NDRG1ファミリー蛋白質の異所的もしくは過剰発現による成魚桿体への影響

錐体でのNDRG1bとNDRG1a-2蛋白質の機能を詳細に検討する目的で、錐体特異的に発現しているNDRG1bとNDRG1a-2蛋白質を*rhodopsin*プロモーターの支配下で全桿体細胞に異所的に発現させ、成魚網膜に対して免疫組織染色を行った。その結果、NDRG1b陽性個体網膜ではmCherryを強制発現した野生型(WT) 個体網膜に比べて桿体外節のマーカーであるGt1aのシグナルが減少していた。そこで、NDRG1b発現個体の網膜から桿体を単離して外節の形態を比較したところ、NDRG1b発現桿体ではコントロール(2%)に比べて10倍以上の割合で、通常は円柱状である桿体外節の先端が細くなった先細の外節を持つ桿体が観察された。また、円柱状の外節の長さが65%程度に短くなっていた。一方NDRG1a-2を異所的に発現した桿体では、WT桿体との明確な形態的相違は認められなかった。また、NDRG1a-1を桿体に過剰発現させたところ、NDRG1b発現桿体と同様の結果が得られた。

NDRG1a-1・NDRG1b蛋白質の強制発現桿体の外節膜構造の検討

桿体の外節は、およそ千枚程度積み重なった円板状の膜の周囲を形質膜が覆った構造をしており、一方錐体の外節は、形質膜が貫入することで何層も折りたたまれたラメラ状の構造をしている。この両視細胞の膜構造の違いはN, N'-didansyl cystine (DDC)による蛍光染色によって光学顕微鏡下で区別することが可能であり、錐体外節のみが非常に強く蛍光を発する。そこで、NDRG1a-1およびNDRG1b強制発現個体から視細胞を単離、染色し、観察した。その結果、どちらの系統でも錐体外節からは強い蛍光が観察される一方で、円錐状の桿体外節からは蛍光は観察されなかった。よって、NDRG1a-1およびNDRG1b強制発現桿体で観察される円錐状の外節は、元々桿体が有する外節膜構造を保ったまま、円錐状の外節へと変性したことが示唆される。

以上の結果より、ゼブラフィッシュにはNDRG1a-1, 2・NDRG1b蛋白質の合計3種類の蛋白質が存在し、そのうちNDRG1a-1・NDRG1b蛋白質が視細胞形成過程において正常な外節形成に必須であることと、また、錐体外節の形態形成または保持にも関与することが示唆される。加えて、錐体の巨視的な外節の形状と微視的な膜構造には直接的な関係がないことが示唆される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (瀧 田 真 平)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 小倉 明彦
	副 査	教 授 古川 貴久
	副 査	准教授 久富 修
論文審査の結果の要旨		
瀧田真平君は、先行研究でコイ錐体特異的に発現している遺伝子 <i>ndrg1b</i> (<i>N-myc downstream regulated gene 1b</i>) の産物タンパクNDRG1bおよびその近縁タンパクの機能について、ゼブラフィッシュを用いて解析して以下の結果をえ、「ゼブラフィッシュにおけるNDRG1ファミリー蛋白質の視細胞外節に対する影響」と題する博士論文を執筆した。 1. ゼブラフィッシュ網膜には、NDRG1b (以下 1b と略記) に加えて、NDRG1a-1 (1a-1 と略記)、NDRG1a-2 (1a-2 と略記) の計 3 種類の近縁タンパクが発現していた。 2. 各タンパクへの特異的抗体を作成して免疫染色したところ、成魚網膜では、1b と 1a-2 は錐体特異的に発現し、1a-1 は桿体にも発現していたが、外節に局在するわけではなかった。 3. 1a-1 と 1b は、網膜の視細胞の形成時期に発現が亢進した。しかし視物質の発現とは平行せず、それに先行した。 4. モルフォリノアンチセンスオリゴによる発現抑制実験では、1a-1 の発現低下は錐体・桿体の外節の縮小を惹起した。1b の発現低下は錐体外節の縮小を惹起した。 5. 1b を桿体に異所的に発現したところ、その外節に短縮と錐体外節の形に似た先細化が惹起された。しかし、錐体外節のような形質膜が陥入した構造に変化したわけではなかった。 元々桿体にも発現する 1a-1 を桿体で過剰発現すると、上と同様な形態異常が惹起された。 以上の結果から、NDRG1ファミリータンパクは、視細胞の形成過程において外節の形態を制御している可能性が示唆された。 これらの結果は、網膜視細胞の形成に関して重要な示唆を与える成果であり、本論文を理学博士の学位を授与するに値するものと判断した。		