

水晶体分化過程における  
リン酸化による転写因子 L-Maf の機能調節機構の研究

越智 陽城

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子発生生物学講座

(影山 龍一郎 教授)

平成 15 年 1 月 7 日

## 目次

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 要旨.....                      | 3  |
| 第一章 序論.....                  | 5  |
| はじめに                         |    |
| 組織/細胞分化のモデル系としての水晶体          |    |
| (1)水晶体分化                     |    |
| (2)水晶体分化を制御する分子機構            |    |
| 1)水晶体分化を制御する分泌因子             |    |
| 2)水晶体分化を制御する転写因子             |    |
| 3)転写因子 L-Maf                 |    |
| (3)本研究の目的                    |    |
| 第二章 材料と方法.....               | 20 |
| (1) 水晶体細胞の初代培養               |    |
| (2) プラスミド                    |    |
| (3) RNA の調整                  |    |
| (4) ノザン解析                    |    |
| (5) 細胞の分画法                   |    |
| (6) ウェスタン解析                  |    |
| (7) 脱リン酸化反応                  |    |
| (8) 細胞増殖の測定                  |    |
| (9) 細胞への遺伝子導入                |    |
| (10) レポータープラスミドを用いた転写活性化能の測定 |    |
| (11) 抗体染色                    |    |
| (12) 大腸菌を用いた融合タンパク質の精製       |    |
| (13) in vitro リン酸化解析         |    |
| (14) ゲル移動度シフト解析              |    |
| (15) プロテアソーム阻害剤を用いた解析        |    |
| 第三章 結果.....                  | 28 |
| 第一節 FGF/L-Maf による水晶体細胞の増殖と分化 |    |
| (1)FGF は水晶体細胞の増殖を促進する        |    |
| (2)FGF は水晶体様構造の形成を促進する       |    |
| (3) FGF はクリスタリンの発現を制御する      |    |

## 第二節 FGF/MEK1/ERK による L-Maf のレポーター活性制御

- (1)培養水晶体細胞において L-Maf はクリスタリンの発現を制御する
- (2)FGF-2 による L-Maf レポーター活性の調節
- (3)FGF-2 は L-Maf レポーターの活性を抑制する
- (4)培養水晶体細胞における FGF による ERK 活性の制御
- (5)内在性の Maf による L-Maf レポーター活性の抑制
- (6)L-Maf の転写活性化能は MEK1/ERK により抑制される
- (7)ERK により L-Maf の Thr57 と Ser65 がリン酸化される
- (8)MAPK 標的配列への変異の導入は転写活性化能を促進する

## 第三節 L-Maf の活性におけるリン酸化の役割

- (1)L-Maf の DNA 結合活性はリン酸化により影響を受けない
- (2)MAPK 標的配列への変異の導入は L-Maf タンパク質の安定性を促進する
- (3)L-Maf タンパク質はプロテアソームにより分解される

## 第四節 繊維細胞における L-Maf タンパク質の発現

- (1)培養水晶体細胞における L-Maf タンパク質の発現
- (2)ニワトリ水晶体における L-Maf タンパク質の発現

## 第四章 考察.....72

- (1)FGF による水晶体細胞の増殖と分化制御
- (2)FGF/ERK による L-Maf の活性調節
- (3)L-Maf の活性を調節する転写後修飾
- (4)水晶体上皮細胞から繊維細胞への分化過程における L-Maf の役割
- (5)繊維細胞分化において FGF シグナルを阻害するメカニズム

## 今後の展望

## 謝辞.....84

## 引用文献..... 85

|                   |                                             |    |                 |
|-------------------|---------------------------------------------|----|-----------------|
| 所属<br>(主指導教<br>官) | 分子発生生物学講座 影山 龍一郎 教授                         |    |                 |
| 氏名                | 越智 陽城                                       | 提出 | 平成 15 年 1 月 7 日 |
| 題目                | 水晶体分化過程における<br>リン酸化による転写因子 L-Maf の機能調節機構の研究 |    |                 |

要旨

水晶体は上皮細胞と繊維細胞の二種類の細胞群から構成される単純な組織である。水晶体囊の前方(角膜側)には一層の上皮細胞が、後方(網膜側)には繊維細胞がみられる。上皮細胞は増殖能を保持しており、増殖帯とよばれるところで細胞分裂し、後方へと押し出され、繊維細胞へと分化する。この上皮細胞から繊維細胞への分化は、一生の間たえずおこり、水晶体は成長を続ける。Coulombre らにより、水晶体を 180 度回転させると上皮細胞が繊維細胞へと分化することが示され、網膜側からのシグナルにより上皮細胞から繊維細胞への分化が調節されていると考えられてきた。近年このシグナルの分子実体が明らかになりつつある。増殖因子である fibroblast growth factor (FGF)や insulin-like growth factor(IGF)は、水晶体と網膜の間に存在する硝子体中に存在し、繊維細胞への分化を促進する活性をもつことから、繊維細胞の分化を司るシグナルとして候補にあげられている。一方、クリスタリンの発現制御機構の解析を通して、水晶体細胞への分化の分子機構の解明が進められてきた。クリスタリンは水晶体固有の性質である透明性に関わるタンパク質であり、bZIP 型転写因子 L-Maf がクリスタリンの発現制御に重要であることが明らかにされている。L-maf は水晶体特異的な発現を示し、c-maf の欠損マウスにおいては水晶体繊維細胞の形成不全が観察されることから、maf 遺伝子は水晶体形成に重要な役割を担うことが示された。しかしながら水晶体形成過程において、転写因子 Maf が細胞外からのシグナルによりどのような調節を受け、転写因子として機能するのかは不明であった。そこで、網膜側からのシグナルによる水晶体細胞の分化の分子機構を解明することを目的とし、ニワトリ L-Maf をもちいて、転写因子 L-Maf の機能が細胞外シグナルによりどのような調節を受けているのか解析をおこなった。

まず、培養した水晶体細胞において、上皮細胞の増殖と上皮細胞から繊維細胞への分化を制御することが知られている FGF が水晶体細胞の増殖およびクリスタリンの発現を調節しているのか解析をおこなった。その結果、FGF が水晶体細胞の増殖を促進する期間は、クリスタリンの発現は FGF により抑制されることが明らかとなった。次に L-Maf の機能が FGF シグナルによる制御されるのか調べた。

Maf の認識配列を 6 つ連結したプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子につないだレポータープラスミドを、培養水晶体細胞に導入し培養液中に FGF を加えて培養した後、レポーター活性を調べた。その結果、FGF が水晶体細胞の増殖を促進する期間は、L-Maf のレポーター活性は抑制されることが明らかとなった。さらにこのレポーター活性は FGF の下流で働く MEK1(MAPKK)によっても同様に抑制されることが明らかとなった。FGF により *L-maf* mRNA の発現は影響を受けないことから、L-Maf タンパク質が直接、FGF シグナルにより制御を受けているのではないかと考え、L-Maf が FGF/MEK1 の下流で働く、Extracellular-signal regulated kinase (ERK)によりリン酸化を受けるか調べた。結果 L-Maf は ERK によりリン酸化を受け、そのリン酸化は主にスレオニンの 57 番目とセリンの 65 番目でおこること明らかになった。

このリン酸化が L-Maf の機能にどのような変化を与えているのか調べたところ、リン酸化を受けない変異型 L-Maf は野生型 L-Maf と比べて高い転写活性化能をもち、さらにリン酸化を受けない L-Maf は高い $\delta$ -クリスタリン誘導能を示すことが明らかとなった。このようなリン酸化を受けない L-Maf タンパク質は野生型と比べて、より安定であり、リン酸化を受けない L-Maf の高い転写活性化能と高い $\delta$ -クリスタリン誘導能は、L-Maf タンパク質の安定性によるものであることを示した。これらの結果は FGF/MEK1/ERK シグナルにより L-Maf がリン酸化され、L-Maf タンパク質が不安定になることを示唆するものである。L-Maf タンパク質の安定化が実際の繊維化においてみられるのか調べるために培養水晶体細胞および個体内の水晶体における L-Maf タンパク質の発現を調べたところ、L-Maf タンパク質は繊維細胞に発現することが明らかとなった。

これらのことから、FGF が水晶体細胞の増殖を促進する期間では、L-Maf タンパク質が FGF シグナルによりリン酸化を受け不安定となり、クリスタリンの発現が誘導されず、FGF シグナルが阻害されると L-Maf タンパク質が安定化し、クリスタリンの発現を誘導し、結果、繊維細胞の分化が促進されることが考えられる。

本研究により、FGF シグナルにより L-Maf の活性が抑制されること、また L-Maf のリン酸化は L-Maf タンパク質の安定性を調節することを明らかにすることができた。このことは水晶体繊維細胞の分化において、網膜側からの誘導シグナルが、水晶体細胞側の転写因子をどのように調節して分化を制御しているのか、その分子機構を考える上で重要な知見であると考えられる。

## 第一章 序論

### はじめに

動物の体を構成する多種多様な細胞は一個の受精卵から生じる。一個の受精卵が増殖、分化をくりかえし、ある特定の機能のみを発揮する細胞集団である組織を形成する。この事象の分子的な基盤は、それぞれの細胞に特異性を与える遺伝子群の転写をどのようにして活性化するのかによって規定されると考えられる。現在までに得られている知見から、特定の細胞のみで発現し、その細胞に特性を与える遺伝子群の転写を担う組織特異的な転写因子が同定されており、これら転写因子の時間的空間的な制御が、特定の機能のみを発揮する細胞集団の形成に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。

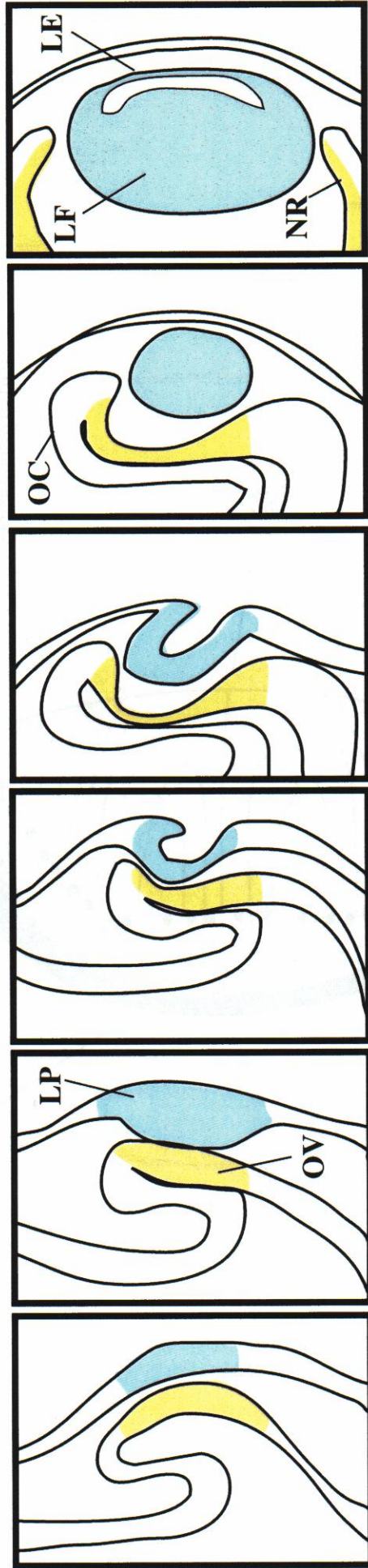
### 組織/細胞分化のモデル系としての水晶体

#### (1)水晶体分化

脊椎動物の眼の形成過程は、前世紀初頭の Spemann と Lewis 以来、古典的な発生学的手法をもちいて研究がおこなわれてきた。この研究の中から、ある組織が隣り合う組織に作用して別の組織に分化させる機構(誘導現象)が発生のあらゆる段階で重要な役割を果たすことがわかってきた。

水晶体は表皮外胚葉のちょうど眼胞(網膜の原基)が接した部分から形成される(図 1-1)。Spemann と Lewis らは眼胞を切除すると本来水晶体に分化すべき外胚葉の領域(予定水晶体外胚葉)が他の外胚葉と同様に表皮になることを示した。すなわち外胚葉から水晶体に分化するには、眼胞から外胚葉へのはたらきかけが必要であること示した。このような眼胞側からの働きかけは、眼の形態形成をとおして重要であることが示されている。

眼胞からの誘導を受けた外胚葉はやがて水晶体プラコードを形成する。水晶体プラコードは次第に内側に陥入しはじめる。このとき水晶体プラコードの陥入に伴って眼胞も内側に陥入し、眼杯となる。陥入した水晶体プラコードはくびりきれて水晶体胞を形成し、眼杯は網膜へと分化する(図 1-1)くびりきれた水晶体をみると、水晶体囊の前方(角膜側)には水晶体上皮とよばれる一層の分裂能をもった細胞が、水晶体囊の後方(網膜側)には水晶体繊維細胞とよばれる脱核した細胞がみられる(図 1-2)。増殖帯とよばれるところ(赤道面)で細胞分裂し増えた細胞は水晶体囊に沿って後方に追いやられ、赤道面を超えたあたりで、繊維細胞へと分化しはじめる。細胞は前後に進展しながら、周りから取り



**Retina lineage**  
**Lens lineage**

図 1-1 水晶体形成の模式図

LP: 水晶体プラコード OV: 眼胞 OC: 眼杯

LF: 水晶体繊維細胞 LE: 水晶体上皮細胞 NR: 神経性網膜

( 文献 Hajime Ogino et. al. 2000 の図の改変した )

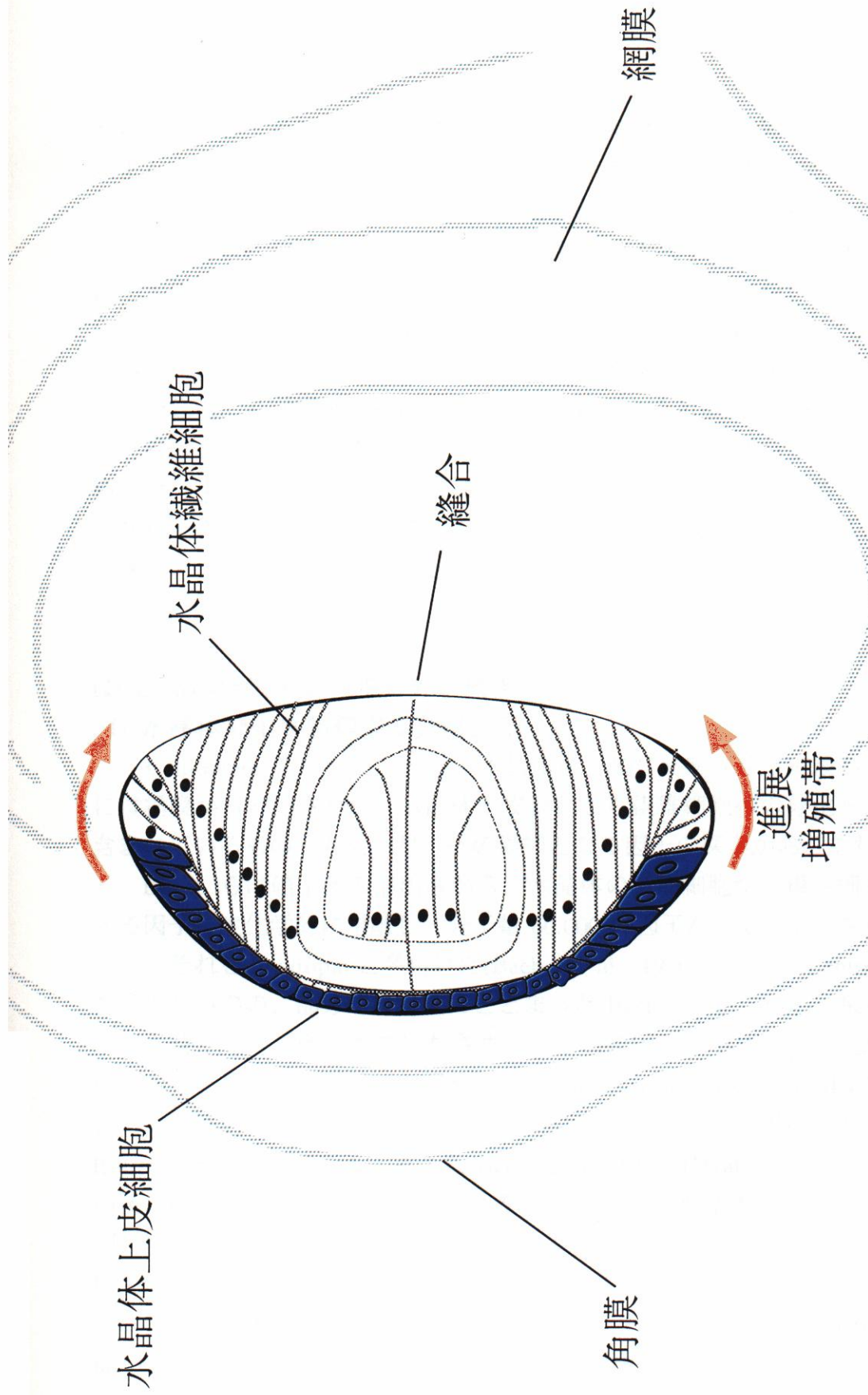


図 1-2 水晶体繊維細胞の分化

水晶体の構造と水晶体繊維細胞の形成過程 水晶体は、水晶体上皮が増殖しつつ水晶体繊維に分化していくことによって成長する。この水晶体上皮の増殖活性の維持、及び上皮から繊維への分化の制御は、網膜から送られるシグナル子によって調節されている。

(文献: Bruce M. Carlson の図を改変した)

囲むようにして伸びてくる。さらに伸びると反対側から進展してきた繊維細胞とまん中(網膜側)でぶつかり、縫合となる。このような繊維細胞への分化は一生の間起こり、たえず外側から繊維細胞が進展していき、巻き付いていく。

Coulombre らはこの水晶体を 180 度回転させると、つまり、上皮細胞が直接硝子体に接するようにすると、もともとの上皮細胞が伸長し繊維細胞へと分化することを示した (Coulombre, J. L. and Coulombre, A. J. 1963 Science 142, 1489-90) (図 1-3)。つまり水晶体胞を形成した後の、水晶体上皮細胞から繊維細胞への分化にも網膜側からの働きかけが必要である可能性を示した。

組織の切除と移植を中心とした実験発生生物学的研究から、このような組織が分化する過程をとおして、異なる組織からの働きかけが重要であることが示されてきた。しかしながら、その現象がどのような分子メカニズムをもとにおきているのかは依然として不明のまま残った。

## (2) 水晶体分化を制御する分子機構

### 1) 水晶体分化を制御する分泌因子

Coulombre らがおこなった、水晶体を 180℃反転させる実験から、硝子体には網膜から分泌された、水晶体上皮細胞から繊維細胞への分化を促す因子が含まれているものと考えられ、その候補となる因子の探索がおこなわれた。

Beebe らは硝子体の抽出液から、水晶体の上皮細胞から繊維細胞への促進する因子を生化学的に単離し、分子量 60,000 の因子が、その活性を持つことを示し、それを Lentropin と名付けた(Beebe et al., 1980)。彼らは Lentropin の精製を試みたものの、部分的な精製にとどまった(Beebe et al., 1987)。最終的には彼らは当時すでに単離されていたさまざまな増殖因子の中に上皮細胞から繊維細胞への分化を促進する因子を求め、insulin-like growth factors (IGFs)がもっとも強い上皮細胞から繊維細胞への分化誘導活性をもつことを明らかとし、IGF が lentropin そのものであると考えた(Beebe et al., 1987) (Hyatt and Beebe, 1993)。その後、 $\alpha$ A-クリスタリンのプロモーターをもちいて水晶体特異的に IGF-I を強制発現させたところ、赤道面上 (増殖帯)において、分裂能を有する細胞が増え、結果的に増殖帯が広がることが明らかとなった (Shirke et al., 2001)。

1988 年、Brewitt らは水晶体の組織培養をもちいて、Platelet-derived growth factors (PDGF)が上皮細胞の増殖と、水晶体の透明化に必要であることを示した (Brewitt and Clark, 1988)。Overbeek らは PDGF レセプターが水晶体の中では上皮細胞側にのみ発現し、さらにリガンドとなる PDGF を $\alpha$ A-クリスタリンのプロモーターの制御下で強制発現させると、水晶体上皮細胞での cyclin D2 と cyclin

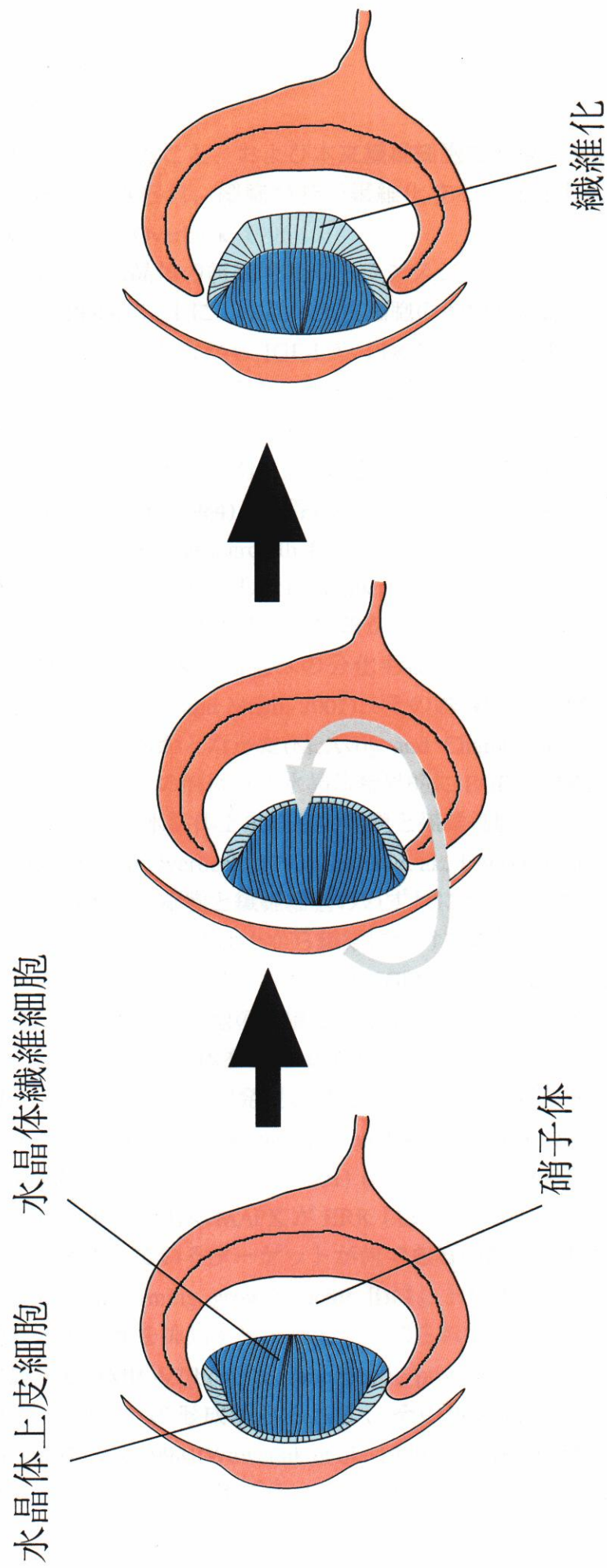


図 1-3  
 水晶体を 180℃回転させると、上皮細胞が繊維化する  
 (文献 : A.J. Coulomeber 1965 の図を改変した)

A の発現が増大すること、および本来繊維細胞で発現する $\beta$ -クリスタリンの発現が上皮細胞でみられ、細胞が若干繊維化すること示した(Schatteman et al., 1992) (Reneker and Overbeek, 1996)。

このように水晶体の組織培養やトランスジェニックマウスを用いた解析から IGF-I と PDGF は主に、水晶体上皮細胞の増殖を促進する活性を持つことが示されてきた。しかしながら IGF-I や PDGF により促進される上皮細胞から繊維細胞への分化が、どのような分子機構を基にしているのか不明のままである。

McAvoy らは培養した神経性網膜細胞の conditional medium 中に水晶体の上皮細胞から繊維細胞への分化を促進する活性が存在することを見出した(McAvoy and Fernon, 1984)。彼等は神経性網膜から繊維細胞の誘導活性をもつ因子を探索し、Fibro blast growth factor-1(basic FGF)と FGF-1(asidic FGF)がその活性をもつことを明らかとした(Chamberlain and McAvoy, 1987) (Schulz et al., 1993)。水晶体の組織培養を用いた実験から、FGF は水晶体上皮細胞の増殖を促進するだけでなく、繊維細胞への分化も促進することが示され(McAvoy and Chamberlain, 1989) (Le and Musil, 2001)、その誘導活性は FGF-1 と比べ FGF-2 がより高いことが明らかとなった(McAvoy and Chamberlain, 1989)。 $\alpha$ A-クリスタリンのプロモーターの制御下で水晶体特異的に FGF を強制発現させた実験から、さまざまな FGF が水晶体上皮細胞の増殖と繊維細胞の分化に関与することが示された (Lovicu and Overbeek, 1998)(Stolen et al., 1997) (Lovicu and Overbeek, 1998)。FGF は水晶体の上皮細胞と繊維細胞のいずれにおいても発現がみられるが、FGF レセプターの 1-3 が赤道面上から繊維にかけての領域に異なった様式で発現することから、McAvoy らはそれぞれの FGFR の下流で異なる分子機構が働くことにより、水晶体上皮細胞の増殖と繊維細胞の分化が調節されていると考えた(de Jongh et al., 1997)。水晶体を FGF の存在下で培養した実験や FGFR3 のドミナントネガティブ型を強制発現させた実験から、水晶体細胞への分化過程では FGF の下流で Extracellular-signal regulated kinase (ERK)が働くことが示されているが(Govindarajan and Overbeek, 2001) (Le and Musil, 2001) (Lovicu and McAvoy, 2001)、FGF の下流で働く MAPK が ERK 以外にも存在するのか、またその MAPK の下流で制御されているターゲットが何であるのか未だ不明である。

TGF- $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ )はヒトの上皮細胞、血管内皮細胞、血球細胞などの増殖を抑制する因子として知られている。TGF  $\beta$  スーパーファミリーに属する BMP 4/7(bone morphogenetic protein)のノックアウトマウスでは、水晶体プラコードの形成がみられず、その後の陥入が起こらないことから(Furuta and Hogan, 1998)(Wawersik et al., 1999)、BMP は眼胞から頭部外胚葉へのシグナル因子として水晶体プラコードの形成の鍵となる因子ではないかと考え

られてきた。BMP のレセプターである TGF $\beta$ レセプターの type I と type II が成熟した水晶体の上皮細胞と赤道面上に発現していることから、McAvoy らは上皮細胞から繊維細胞への分化に TGF- $\beta$ シグナルが関わっているのではないかと考え、カイネースドメインを欠失した TGF- $\beta$ レセプターを $\alpha$ A-クリスタリンのプロモーターの制御下で発現させ、繊維細胞分化における TGF- $\beta$ シグナルの役割について解析をおこなった(Maruno et al., 2002)。水晶体上皮細胞は FGF-2 の刺激により、水晶体細胞が migration することが知られているが、TGF  $\beta$ シグナルを細胞内に伝達でない上皮細胞は、FGF-2 依存的な migration が起こらず、また水晶体特異的な遺伝子の発現も減少する。このことから、TGF- $\beta$ シグナルは分化した繊維細胞が後方へ追い込まれるときの migration に必要なのではないかと考えられる。

水晶体の分化を制御する分泌因子に関するこれまでの知見をまとめると、IGF-I と PDGF は主に水晶体上皮細胞の増殖を、FGFs は上皮細胞の増殖と繊維細胞の分化を、TGF $\beta$ シグナルは繊維細胞の分化と繊維細胞の移動を制御することが考えられている。

### 3) 水晶体分化を制御する転写因子

眼の形態形成をとおして、水晶体は眼胞側からの誘導因子により分化が制御されている。この誘導シグナルを受け水晶体細胞となるにはその細胞内において、水晶体細胞の特異性を与える遺伝子群の発現が活性化される必要がある。現在までに水晶体細胞への分化に関わる転写因子が同定されており、これら転写因子の役割が明らかになりつつある。

#### Pax-6 眼形成の中心となる転写因子

Pax-6 はペアード-タイプ-ホメオドメインを DNA 結合モチーフとしてもつ転写因子である。ヒトの無虹彩症の原因遺伝子として PAX-6 が、またマウスとラットでは小眼症の原因遺伝子として Pax-6 が同定されたことから、Pax-6 が眼形成に関与されることが示唆された(Hill et al., 1991)。1994 年、ショウジョウバエの眼のない変異体 eyeless(ey)の原因遺伝子が Pax-6 のホモログであり(Quiring et al., 1994)、ey を眼の成虫原基で強制発現させると眼が誘導されることが示された。さらに、種々の生物の Pax-6 を眼の成虫原基で異所的に発現させると、ey と同様に眼が誘導されることが明らかとされ(Halder et al., 1995)、Pax6 が眼分化の中心的な役割を果たす転写因子として考えられるようになった。

Pax-6 の発現は眼胞と頭部外胚様においてみられ、水晶体嚢が形成された後は水晶体上皮細胞でその発現がみられる。(総説 (Kondoh, 1999))。Pax6 の変異体ラットでは本来水晶体プラコードが形成される時期に眼胞と頭部外胚様が野生型と同様に近接しているにも関わらず、頭部外胚様の肥厚がみられないことから、Pax6 は水晶体プラコードの形成に必要であると考えられている。しかしながら、Pax6 はマウスの水晶体繊維細胞に発現している $\beta$ B1-クリスタリンの発現を抑制することから(Duncan et al., 1998)、Pax6 は水晶体嚢が形成されてから後は、水晶体上皮細胞で $\beta$ B1-クリスタリンの発現を抑制し、繊維細胞への分化を抑制することが考えられている。

Pax6 は眼形成を通して中心的な役割を果たす転写因子であるが、その機能がどのような修飾を受けることにより調節されているのかは不明である。

## Sox

水晶体には、その透明化に必要なタンパク質であるクリスタリンが多く含まれている。白内障のような水晶体が白濁する疾患はこのクリスタリンタンパク質の異常によって引き起こされることが明らかとなっている。近藤らのグループはニワトリ $\delta$ -クリスタリンの水晶体特異的な発現制御機構を培養細胞もちいて解析し、 $\delta$ -クリスタリンの 3rd イントロン内に水晶体特異的な発現を司るエンハンサーがあることを見出した(Hayashi et al., 1987)。この 3rd イントロンに結合する転写因子を 13 日目胚の水晶体由来の cDNA ライブラリーを用いてサウスウエスタン法を用いて結合する因子を探索し、 $\delta$ -クリスタリンの水晶体特異的なエンハンサーに結合する因子 $\delta$  EF1 と SOX を同定した。 $\delta$  EF1 は DNA 結合ドメインとして Zinc Finger を 2 つ独立にもつ転写抑制因子であり、クリスタリンの発現を抑制するものと考えられている(Kamachi et al., 1995)。SOX は約 80 アミノ酸残基からなる HMGbox を DNA 結合ドメインとしてもつ転写因子であり、これまでに多数の関連因子が発見されている(Wegner, 1999)。

Sox 遺伝子はさまざまな領域で発現しているが、水晶体系列の細胞では水晶体胞が頭部外胚葉に接する時期に、頭部外胚葉の腹側で Sox2/3 の発現がはじまる (総説 (Kondoh, 1999))。水晶体胞が形成された以降からは、Sox1 の発現が水晶体で強くみられるようになり(Kondoh, 1999)、さらに成熟した水晶体では、Sox1 の発現は水晶体繊維細胞側で強く見られるようになる。Sox1 遺伝子をノックアウトすると、水晶体繊維細胞の形成がみられず、 $\delta$ -クリスタリンの発現も減少することから、Sox1 は水晶体繊維細胞の分化に必要であることが示され

た(Nishiguchi et al., 1998)。

Sox の発現は水晶体プラコードが形成されるより前の時期から見られる(Kamachi et al., 1998)。このことから近藤らは、SOX は $\delta$ -クリスタリンの発現のみならず、水晶体プラコードの形成にも関与しているのではないかと考え、SOX と相互作用する因子を Yeast-two hybrid スクリーニング法により探索した。その結果、眼の分化のマスターレギュレーターである PAX6 が SOX と相互作用する因子として単離され、SOX が PAX と協調的に水晶体プラコードの形成時期においても機能していることが考えられている(Kamachi et al., 2001)。

### Six3

Six3 は *Drosophila* の *Sine oculis* の脊椎動物ホモログであり、Six ファミリーは保存された Six ドメインと(SD ドメイン)とホメオドメインをもつ。Six3 は水晶体プラコードに発現がみられ、成熟した水晶体では上皮細胞に発現することが知られている(Bovolenta et al., 1998)。Six3 をメダカに強制発現すると、耳胞が水晶体に分化することが示され、水晶体分化に重要な転写因子であることが明らかとなった(Oliver et al., 1996)。最近、Six3 は転写抑制因子 Grg3 (Groucho-related proteins)と相互作用することが示された(Goudreau et al., 2002)。Six3 と Groucho 関連因子を水晶体誘導が起こる時期(stage 10)のニワトリの頭部外胚葉に強制発現すると $\delta$ -クリスタリンの発現を抑制され、水晶体のサイズが小さくなることが示された(Goudreau et al., 2002)。Six3 が転写の抑制因子と相互作用し、どのような遺伝子の発現をいつ抑制することが、眼の形態形成に必要なのかは明らかとはなっていない。

### Prox1

Prox1 はもともと *Drosophila* の *Prospero* の脊椎動物ホモログとして単離された。Prospero は神経発生で娘細胞への Prospero タンパク質の分配を介して細胞種の分化に関与することが示されていた。ニワトリとマウスでは水晶体で強い発現がみられ(Oliver et al., 1993)、Prox1 のノックアウトマウスでは、水晶体繊維細胞の分化がみられず、水晶体胞の大きさが比較的小さくなる(Wigle et al., 1999)。さらに、本来、水晶体上皮細胞から繊維細胞への分化がおこる赤道面上では cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI)である p27/KIP1 と p57/KIP2 の発現がみられるのに対して、prox1 のノックアウトマウスの水晶体ではこれら CDKI の発現がみられないことから、prox1 は水晶体繊維細胞へと分化する際に必要と

なる転写因子でないかと考えられている。

このように Pax6、Sox や Six は眼胞と水晶体プラコードの形成に重要な転写因子であり、水晶体嚢が形成された後は、Pax6 と Six3 は上皮細胞で、Prox1 と Sox1 は繊維細胞の分化に働いていることがわかる。しかしながらこういった転写因子が眼胞や網膜からどのようなシグナルを受け、その活性が調節されているのか全く明らかとなっていない。

### 3) 転写因子 Maf

#### 水晶体特異的 Maf 遺伝子 L-Maf

1990 年松尾らによりニワトリ  $\alpha$ A-クリスタリン遺伝子の水晶体特異的エンハンサーとして、 $\alpha$ CE1、 $\alpha$ CE2、 $\alpha$ CE3 が同定された(Matsuo et al., 1991) (図 1-4, A)。 $\alpha$ CE1 と  $\alpha$ CE2 を組み合わせると協調的に水晶体特異的な転写を促進することが明らかにされ、 $\alpha$ CE1 と  $\alpha$ CE2 が  $\alpha$ A-クリスタリンの水晶体特異性を担うエンハンサーであると考えられた。

$\alpha$ CE1 に結合する因子は、ヒヨコ脳の核抽出液から  $\alpha$ CE1 配列をもちいた DNA アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製された。さらに精製産物に対するマウスモノクローナル抗体を作成し、水晶体細胞の cDNA ライブラリーをもちいた発現スクリーニングにより、転写因子 p64/cCP2 が同定された(Murata et al., 1998)。しかしながら p64/cCP2 の発現は胚全体で見られたことから、単独では水晶体特異的な発現を担うことができないものと考えられた。

一方、 $\alpha$ CE2 に結合する転写因子として、サウスウエスタン法をもちいてニワトリ水晶体細胞の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、*c-maf* 遺伝子がクローニングされた(荻野、博士論文)。*c-maf* は水晶体に発現しているものの、T 細胞など水晶体以外の細胞や組織での発現が見られる。そこで水晶体特異的な *maf* 遺伝子を探索するために、Maf タンパク質間で保存されている領域に対して縮重プライマーを設計し RT-PCR を行ったところ、水晶体特異的に発現する新規 *maf* 遺伝子 *L-maf* (*Lens-specific-maf*) が単離された(Ogino and Yasuda, 1998)。ニワトリ *L-maf* は水晶体プラコードが肥厚する時期から水晶体細胞に特異的に発現する(Ogino and Yasuda, 1998) (図 1-4, B)。さらに培養神経性網膜細胞やニワトリの頭部外胚様に L-Maf を強制発現させると、 $\delta$ -、 $\alpha$ A-、 $\beta$ B1-クリスタリン、フィレンシンの発現が誘導されることから (図 1-4, C)、L-Maf はクリスタリン遺伝子の水晶体特異的な発現を担う重要な転写因子であると考えられた。

## Maf 遺伝子

### Maf 遺伝子の構造

Maf 遺伝子はもともとニワトリに感染して筋腱膜繊維肉腫 (Musculoaponeurotic fibrosarcoma) を引き起こす AS42 ウイルスから、その原因遺伝子、v-maf (viral-maf) として単離された (Nishizawa et al., 1989)。その細胞性の相同遺伝子として c-maf がニワトリから単離された (Kataoka et al., 1993)。

c-Maf の構造は N 末端側から塩基性アミノ酸に富む acidic 領域、Jun、Fos などの bZIP 型転写因子にみられる basic 領域とロイシンジッパー領域の 3 つのドメインからなる (Kataoka et al., 1996)。酸性アミノ酸領域を欠失した実験から、この領域が VP16 などと同様に転写活性に必要なドメインであることが示された (Kataoka et al., 1996)。その後、*mafB*、*Nrl*、*L-maf*、*mafK*、*mafF*、*mafG* がクローニングされ bZIP 型転写因子としてファミリーを形成していることが明らかとなった (Motohashi et al., 1997) (Blank and Andrews, 1997)。これらの Maf ファミリーのなかで N 末側に酸性アミノ酸領域をもつ c-Maf、MafB、L-Maf、Nrl、S-Maf を large Maf、酸性アミノ酸領域を持たないものを small Maf と区別される。Large Maf は認識配列特異的な転写活性化因子である。それに対して small maf は、自身には転写活性化能はなく他の bZIP のパートナーとヘテロ 2 量体を形成して転写を活性化する場合と、認識配列特異的に転写を抑制する場合が知られている (Blank and Andrews, 1997)。

## Maf と器官形成、細胞分化

### 眼形成と Maf

ニワトリの水晶体特異的な *maf* 遺伝子が同定されて以降、さまざまな動物種において水晶体に発現している *maf* 遺伝子が単離され、それら遺伝子の眼形成における役割が明らかになりつつある。

#### (a) マウス

マウスやラットでは *mafB* と *c-maf* が水晶体に発現していることが *in situ* ハイブリダイゼーション法により明らかにされている。特に *c-maf* は水晶体繊維細胞に、*mafB* は水晶体上皮細胞に発現する。*c-maf* のノックアウトマウスでは水晶体繊維細胞の形成が不完全となり、また種々のクリスタリンの発現が減少することが報告されている (Kim et al., 1999) (Kawauchi et al., 1999) (Ring et al.,

2000)。これらのことからマウス c-Maf は水晶体繊維細胞の分化に必要であることが明らかとなっている。しかしながら MafB の水晶体における機能については不明である。

#### (b) カエル

アフリカツメガエルの水晶体に発現する *maf* 遺伝子は、当研究室の石橋によりクローニングされた(Ishibashi and Yasuda, 2001)。*in situ* ハイブリダイゼーションの結果により *XL-maf* と *XmafB* が水晶体プラコードができる時期から水晶体系列の細胞で発現し、最終的に *XL-maf* が水晶体繊維細胞に *XmafB* が水晶体上皮細胞に発現するようになる。このような発現様式の違いから、XL-Maf と XMaFB の水晶体での機能が異なることが考えられた。それぞれの下流で制御される遺伝子が異なるのかアニマルキャップアッセイ法で調べたところ、XMaFB は水晶体の上皮細胞で発現する Pax6 や Xlens1 などの遺伝子の発現を促進することができるが、XL-Maf はできないことが示された。

#### (c) ゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュの水晶体で発現する *maf* 遺伝子は当研究室の梶原により単離されている(Kajihara et al., 2001)。ゼブラフィッシュ *c-maf* と *mafB* は受精後 20 時間胚において水晶体での発現がみられることが確認されている。受精後 28 時間胚を *in situ* ハイブリダイゼーションおこない、水晶体の切片を作成し詳しく観察した結果、*mafB* は水晶体全体で発現し、*c-maf* が水晶体繊維細胞に局限して発現することが示されている。

### Maf の水晶体形成における役割

以上をまとめると、動物種を超えて、水晶体形成に転写因子 Maf は、重要なはたらきをしていると考えられる。ニワトリとアフリカツメガエルの *maf* 遺伝子の詳細な発現解析から、*maf* 遺伝子は水晶体プラコードが形成される時期から発現し(Ishibashi and Yasuda, 2001) (浦野充代、修士論文)、水晶体胞が形成されてからは *mafB* が水晶体上皮細胞で、*L-maf* が水晶体繊維細胞で発現すること、またゼブラフィッシュでは *mafB* は水晶体全体に発現するが、*c-maf* は繊維細胞に局限して発現することが明らかとされている。さらにマウス *c-maf* の欠損により繊維細胞の形成がみられないことが示されている。

これらのことから少なくとも水晶体胞が形成されてからは、Maf 遺伝子が水晶体繊維細胞の分化を Maf ファミリー間で異なる機能を発揮しながら制御していることが考えられる。

### (3) 本研究の目的

現在までに水晶体分化をコントロールする転写因子が多く同定されてきた。これら転写因子の分子ネットワークが調べられ、Pax6/Sox2 の下流で L-Maf が機能し、さらに L-Maf の下流では Prox1 が働くことが示されており(Reza et al., 2002)、水晶体分化に関わる分子ネットワークの一端が徐々に明らかになりつつある。この分子ネットワークの中で、転写因子が正しいタイミングで活性化されることにより、細胞に特性を与える遺伝子群の転写が始まり、特定の機能のみを発揮する細胞集団が形成されていく。

水晶体は網膜からのシグナルを受けながら分化する組織である。この網膜からのシグナルにより、転写因子の活性化のタイミングが制御され、水晶体分化に関わる遺伝子群の発現が調節されていると考えられるが、その分子機構については依然として不明なままである。そこで本研究では、水晶体の上皮細胞から繊維細胞への分化に焦点をあて、転写因子 Maf の活性がどのようにして制御されることにより、繊維細胞への分化因子として働きうるのか解析をおこなった。

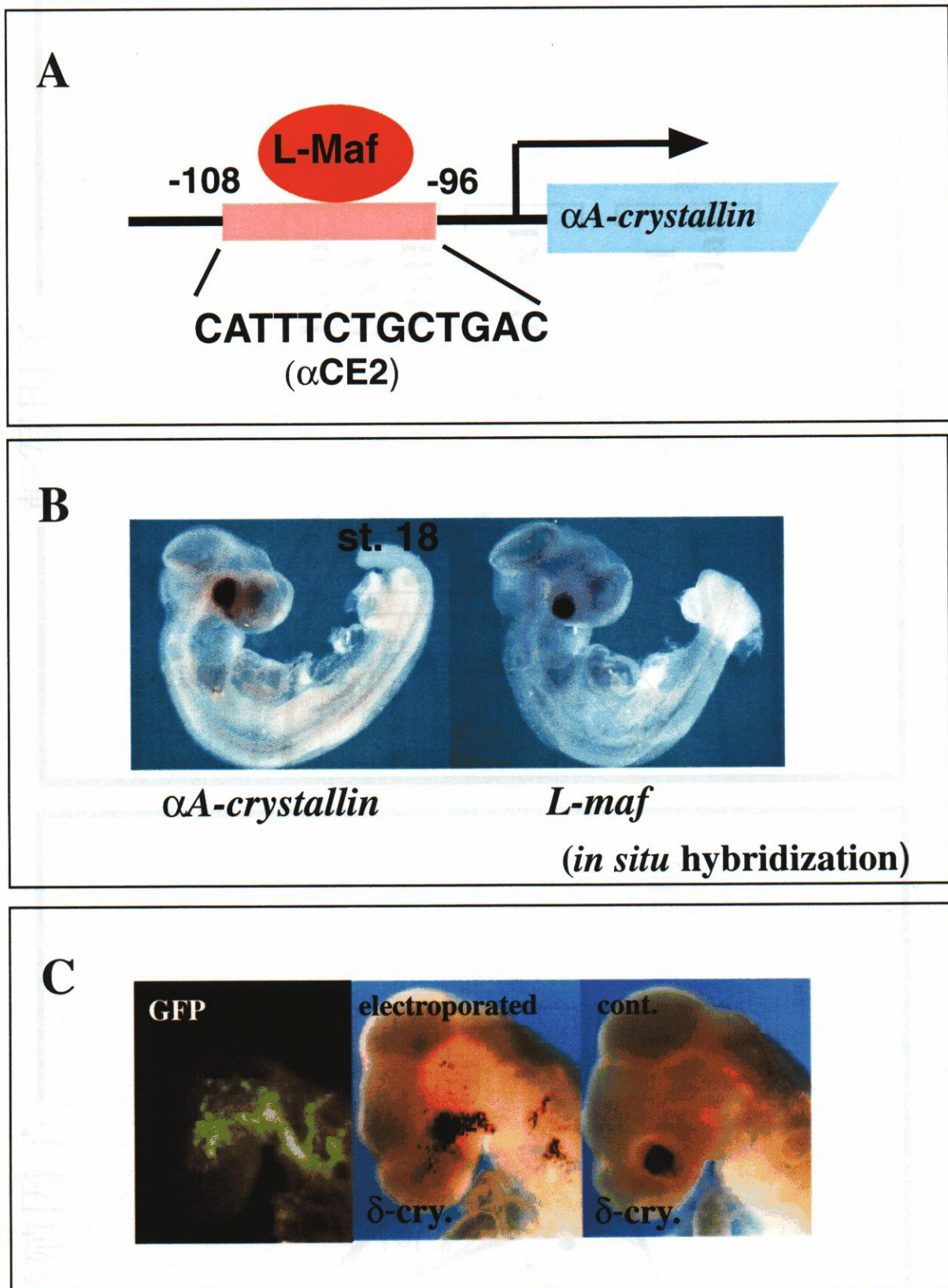
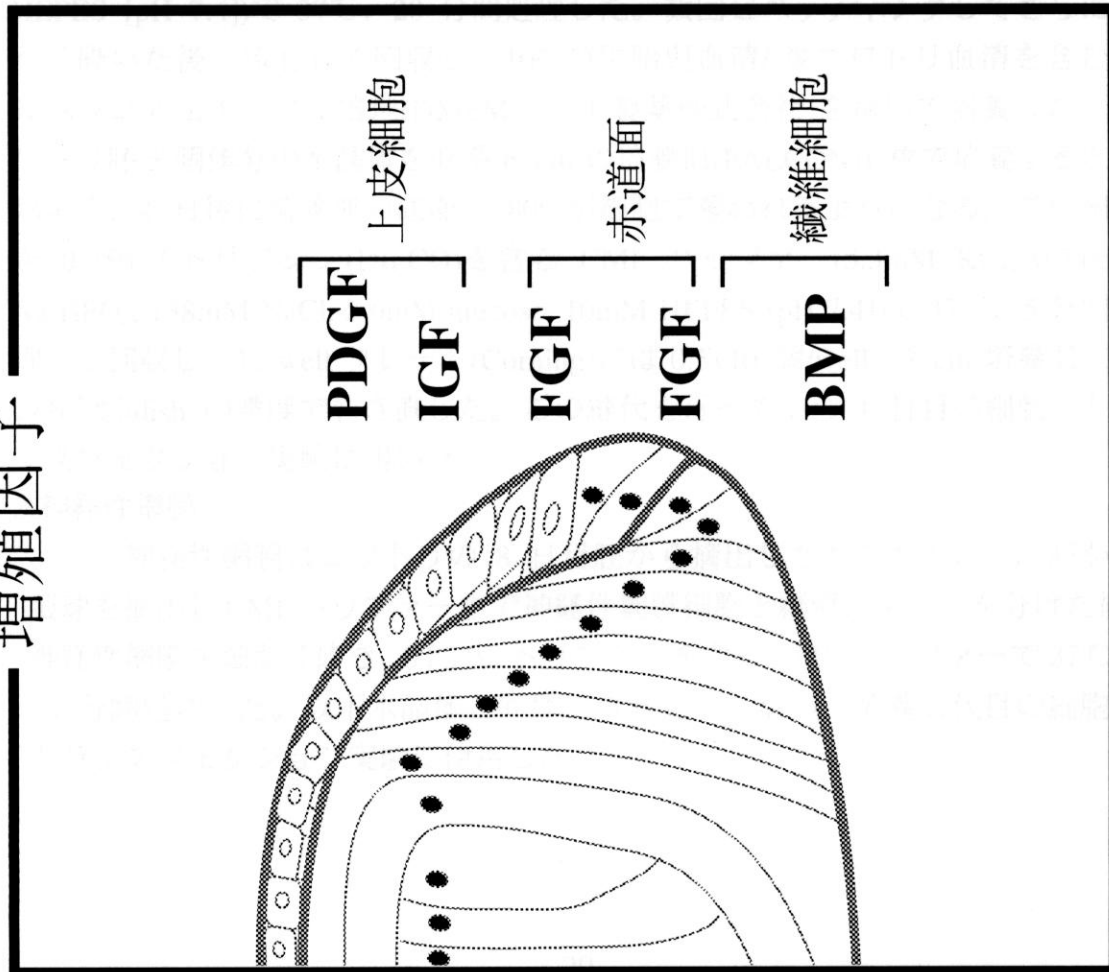


図 1-4

(A)L-Maf は水晶体特異的な遺伝子であるクリスタリンの発現を制御する。(B)*L-maf* mRNA は水晶体特異的に発現する。(C)L-Maf を本来クリスタリンが発現しない領域のニワトリ胚の頭部外胚葉に強制発現させると、異所的にクリスタリンの発現を誘導することができる。Green fluorescence protein (GFP) 発現プラスミドは L-Maf と共導入し、シグナルが検出されているところは L-Maf が導入された領域を示している。

(Hajime Ogino et. al. 1997 の図を改変した)

## 増殖因子



## 転写因子

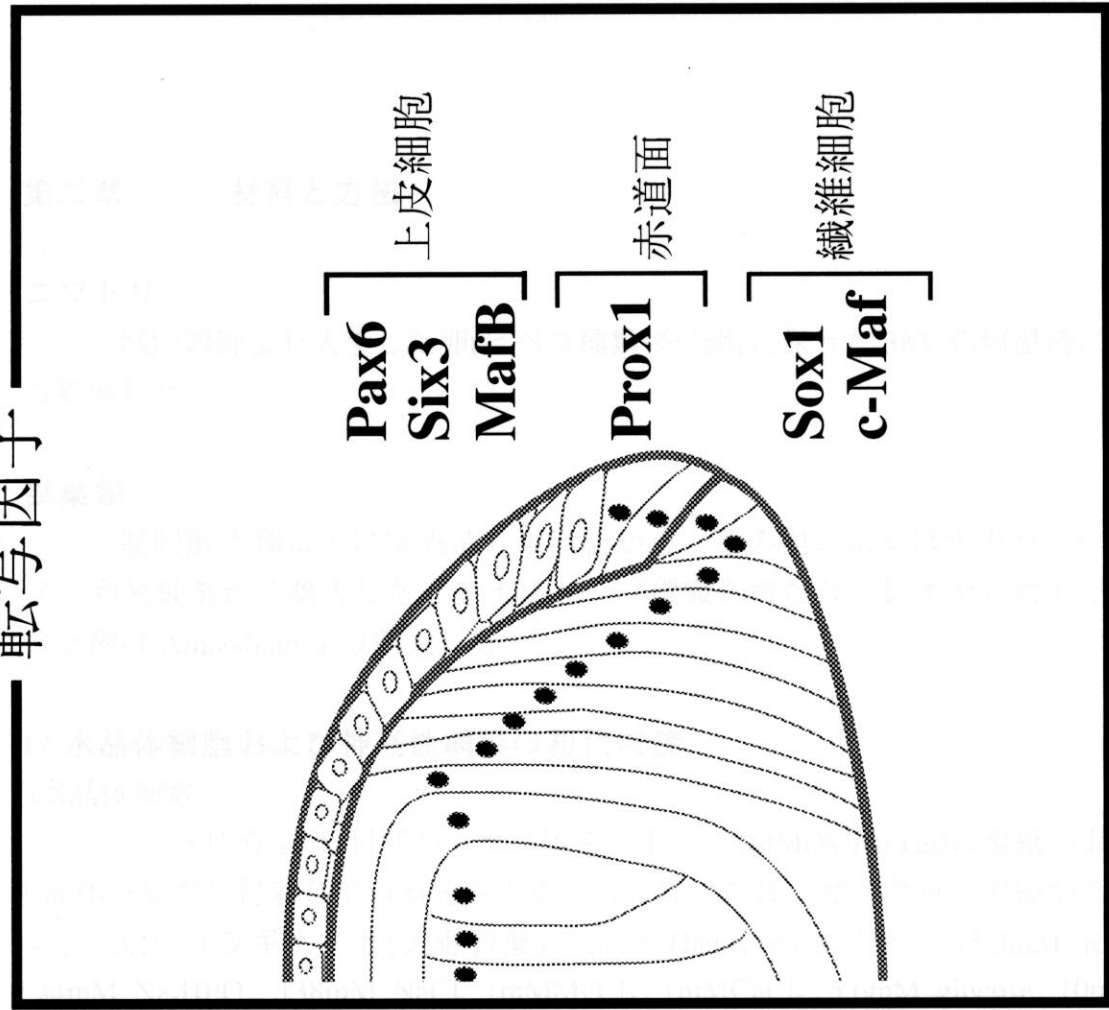


図 1-5  
水晶体上皮細胞の増殖と繊維細胞への分化を制御する分子

## 第二章 材料と方法

### ニワトリ

城山鶏園より入手した卵(ピペコ種類)を湿度に保った 38℃の恒温槽にいで孵卵した。

### 試薬類

制限酵素類は主に宝酒造、東洋紡から、その他の試薬はナカライテクスと和光純薬から購入した。アイソトープ標識されたヌクレオチドおよびアミノ酸は Amersham より購入した。

#### (1) 水晶体細胞および神経性網膜の初代培養

##### 1)水晶体細胞

ニワトリの 14 日目胚から水晶体を摘出し、3MM(Whatman)の濾紙の上で水晶体を転がし付着している色素上皮を取り除いた後、ピンセットで細かく砕いて、0.1%コラギナーゼ(天野製薬)を含む Hanks バッファー (5.3mM KCl, 0.34mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 138mM NaCl, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 5.6mM glucose, 10mM HEPES [pH 7.4])で 37℃、20 分間処理した。数回ピペッティングしてさらに細かく砕いた後、遠心して回収し、10%の牛胎児血清/1%ニワトリ血清を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM、日本製薬株式会社)を用いて培養した。ニワトリ胚 5 個体分の水晶体を直系 6 cm の培養皿(FALCON)1 枚で培養すると、およそ、4 日後に培養皿の底面の 80%が細胞で覆われるようになる。この細胞を 0.05%ノトリプシン(DIFCO)を含む CMF バッファー(5.3mM KCl, 0.34mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 138mM NaCl, 5.6mM glucose, 10mM HEPES [pH 7.4])で 37℃、5 分間処理して回収し、12-well プレート(Corning)には  $0.5 \times 10^5$  個/well、3 cm 培養皿には  $1 \times 10^5$  個/dish の濃度で巻き直した。この継代を行ってから 1 日目の細胞をトランスフェクション実験に用いた。

##### 2)神経性網膜

神経性網膜はニワトリの 8 日目胚から摘出したものを用いた。胚から眼球を摘出し CMF バッファー中で神経性網膜細胞と網膜色素上皮を分けた後、神経性網膜を細かく砕き、0.25 % トリプシンを含む CMF バッファーで 37℃、10 分間処理した。以下水晶体と同様に培養をおこない、培養二代目の細胞をトランスフェクション実験に使用した。

## (2) プラスミド

一般的な DNA の取り扱いに関しては主に Molecular cloning-2 edition (Sambrook J, et, al. Cold Spring Harbor laboratory Press 1989)を参考にした。

### 1) pGV3 UAS×6

UAS 配列の 5'側に *Bam*HI、3'側に *Bgl*II 制限酵素認識部位をもつセンス鎖とアンチセンス鎖ををアニリングした後、*Bam*HI、*Bgl*II で消化させながらタンデムライゲーションをおこない、UAS 配列が 6 個連結したものを作製した。作成された 6x フラグメントを pGVβLuc と pGVtkLuc の *Bam*HI に挿入した。

USAs : 5'- GAT CCG GAG GAC TGT CCT CCG A

UASa: 5'-GAT CTC GGA GGA CAG TCC TCC G

### 2) pCMX-GAL4-Elk1

Elk-1 の転写活性化領域 (307~428)を増幅するプライマーを用意した。

T7ELK 1-428(Treisman, R.博士より供与) (Marais et al., 1993))を鋳型として PCR 反応(95℃、5 min. → {94℃、30 sec. → 60℃、1 min. → 72℃、1 min.} × 25 → 72℃、7 min.)をおこなった。増幅産物を *Bam*HI と *Eco*RV で消化し、pCMX-GAL4 new(梅園和彦博士より供与)の *Bam* HI と *Eco* RV サイトに挿入した。

Elk 1 AD s : 5'-CCG GAT ATC ATC TCC CAG CCG CAG AAG GG

Elk 1 AD a : 5'- CGC GGATCC TGG CTT CTG GGG CCC TGG GG

### 3) pCMX-GAL4-L-Maf AD

pEFX-FLAG-L-maf を *Eco*RI と *Eag*I で消化し、L-Maf 1~449bp を Klenow 酵素で平滑末端化した。pCMX-GAL4 を *Asp*718 で消化し平滑末端化をおこなった。この *Asp*718 サイトに L-maf の転写活性化ドメインを挿入した。

### 4) pEFX-FLAG-L-Maf S14A/T57A/S65A

pEFX3-fg-L-maf から *Eco*RI と *Eag*I で L-maf の cDNA(FLAG 配列と L-

Maf(1~449bp)を切り出し、pBluescript に挿入した(pBsk-L-maf)。この pBsk-L-Maf を鋳型として MAP キナーゼ標的配列中のセリン/スレオニン残基をアラニンに置換した。変異の導入には STRATAGENE 社の QuikVchange Site-Directed Mutagenesis Kit を用いた。PCR 反応は 95℃、30 sec. → {95℃、30 sec. → 55℃、1 min. → 68℃、2 min.} × 16 でおこなった。各プライマーは以下のとおりデザインした。変異が導入されたことをシーケンス配列上で確認し、EcoRI と Eco52I で切り出した cDNA を pEFX3-fg-L-Maf の EcoRI と Eco52I サイトに挿入した。

chick L-maf S14A : GCT GCC CAC CGC CCC CCT CGC CAT CG

chick L-maf S14A c : CGA TGG CGA GGG GGG CGG TGG GCA GC

chick L-maf T57E :5' CCC CTC TCA GCG AGC CGT GCT CCT CCG TGC C

chick L-maf T57E c :3' GGG GAG AGT CGC TCG GCA CGA GGA GGC ACGG

chick L-maf S65A : CCG TGC CTT CCG CGC CCA GTT TCT GC

chick L-maf S65A c : GCA GAA ACT GGG CGC GGA AGG CAC GG

#### 4) pGEX 6P1-L-Maf S14A/T57A/S65A

pEFX-FLAG-L-Maf の野生型/変異型それぞれ NcoI で消化し平滑末端化をおこない、pGEX 6P-1 (Pharmacia)を XhoI で消化し平滑末端化をおこなったサイトに挿入した。

### (3) RNA 抽出

培養水晶体細胞からの全 RNA の抽出は ISOGEN(ニッポンジーン)を用いた。細胞の 10 倍量の ISOGEN を加えてホモジナイズし、ISOGEN の 1/5 倍量のクロロホルムを加えて遠心分離をおこなった。その後水層に対してフェノール/クロロホルム抽出をおこない、2-プロパノールを用いたアルコール沈澱により RNA を回収した。

#### (4) ノザン解析

主に Maegawa らの方法(Maegawa et al., 1999)に従った。精製した RNA(0.5-2  $\mu$ g)を、1%アガロースゲル(1.6%ホルムアルデヒド)を用いて電気泳動し、ナイロンメンブレン(Pall 社)にプロットした。メンブレンをメチレンブルー溶液(0.5M 酢酸ナトリウム pH5.3、0.04%メチレンブルー)により染色し、rRNA を検出した。メンブレンを洗浄後、DIG 標識 DNA をプローブとして 42°C、16 時間ハイブリダイゼーションをおこなった。(hybridization buffer; 50% ホルムアミド、2%ブロッキング試薬、0.1% SDS、0.1% N-ラウロリルサルコシン、200 $\mu$ g/ml 酵母 tRNA)。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを 0.1xSSC/0.1%SDS、60°C で洗浄した。その後、アルカリホスファターゼ融合抗 DIG 抗体(Roche)を用いて検出した。

#### (5) 細胞の分画法

核抽出液の調整は Matsuo らの方法(Matsuo and Yasuda, 1992)に従った。細胞を PBS で 1 回洗い、1ml の PBS で細胞を回収した(3000rpm、3 分間)。400 $\mu$ l の Buffer A を加えて氷中で 15 分間静置した。25 $\mu$ l の 10%NP-40 を加えた後 6000rpm (TOMY, MRX-150)、30 秒間遠心分離をおこない、沈殿物を核抽出液とした。

#### (6) ウェスタン解析

核抽出液の調整は Matsuo らの方法(Matsuo and Yasuda, 1992)に従った。培養水晶体細胞から調整した核抽出液を SDS-PAGE にて展開し、ニトロセルロースメンブレン(ポアサイズ 0.45  $\mu$ m: Schleicher and Schuell)にブロッキングした。5%スキムミルクを含む PBS-T バッファー(140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% Tween)にて室温、1 時間ブロッキングをおこない、抗体を含む PBS-T バッファーに置き換えて室温、1 時間反応させた後、PBS-T バッファーで 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した。2 次抗体に HRP 標識した抗体を用いて室温、1 時間反応させた後、洗浄を 3 回繰り返した。その後、ECL キット(Amersham 社)を用いて HRP による発光をフィルムに露光した。

精製抗 L-maf 抗体: 1:1000

抗 FLAG 抗体: 1:8000 (Santa Cruz Biotechnology)

抗ウサギ IgG HRP: 1:1000 (DAKO)

抗マウス IgG HRP: 1:1000 (DAKO)

### リン酸化型 ERK の検出

初代培養水晶体細胞を、直径 3 cm の培養皿に  $1 \times 10^5$  個/dish の濃度で 2 日間培養し、血清を取り除くために Hanks で 2 回洗浄した後、4 時間、無血清の OPTI-MEM (GIBCO BRL) 培地を用いて培養した。FGF-2 を加える 1 時間前に  $100 \mu\text{M}$  PD98059 (CALBIOCHEM) を培養液中加入した。50 ng/ml FGF-2 を加えて 1 時間培養した後、全細胞タンパク質を調整し、抗リン酸化型 ERK 抗および体抗 ERK 抗体をもちいてウェスタン解析をおこなった。

### (7) 脱リン酸化処理

主に Kato らの方法(Kato et al., 1993)に従った。COS 細胞に pEFX-L-maf を強制発現させた後、核抽出液を調整した。 $50 \mu\text{l}$  の Calf intestinal phosphatase buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0、1mM  $\text{MgCl}_2$ 、1mM APMSF)に 40 units CIP と核抽出液を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、3 時間反応した。SDS-PAGE で展開した後、抗 FLAG 抗体をもちいて L-Maf タンパク質を検出した。

### (8) 細胞増殖の測定

初代培養水晶体細胞を、直径 3 cm の培養皿に  $1 \times 10^5$  個/dish の濃度で培養し、底面に張り付いたことを確認した後(約 1 日後)、100 ng/ml になるように human Recombinant FGF-2 (PeproTech House)を培養液中(10% FBS/1% chick serum/DMEM)に加え培養した。それぞれの培養水晶体細胞を 0.05%トリプシンで  $37^\circ\text{C}$ 、5 分間処理し、ピペッティングで細かく砕いた後、遠心して細胞を回収した。細胞をトリパンブルー溶液(3mg/ml CMF)で死細胞を染色した後、血球計算盤で細胞数を測定した。サンプルはそれぞれ 3 度、測定した。

### (9) 培養水晶体細胞および培養神経性網膜への遺伝子導入

培養水晶体細胞および培養神経性網膜への遺伝子の導入は DEMRI-C Reagent (Gibco BRL)を用いた。 $500 \mu\text{l}$  の OPTI-MEM 培地(Gibco BRL)に対して、全量  $0.5 \mu\text{g}$  の DNA と  $2 \mu\text{l}$  の DEMRE-C Reagent を加え、転倒攪拌し室温、20 分間静置した。培養細胞は血清を取り除くために Hanks で 1 回洗浄した。Hanks を取り除いたのち、混合液を培養細胞に加えて  $37^\circ\text{C}$ 、4 時間、5% $\text{CO}_2$  で培養した後、Hanks で 2 回洗浄した後、10%FBS/1% chick serum/DMEM を加えて培養を続けた。12 well プレーットの 1 穴あたり、 $500 \mu\text{l}$  の OPTI-MEM、3 cm 培養皿では 1 ml の OPTI-MEM を用いた。

## (10) レポーター解析

### 1) 遺伝子導入および細胞の調整

初代培養水晶体細胞を 12-well プレート(Corning)に、 $0.5 \times 10^5$  cell/well の細胞濃度で培養した。1 well あたり 0.3  $\mu\text{g}$  のレポータープラスミド、0.1 $\mu\text{g}$  のエフェクタープラスミド、0.1  $\mu\text{g}$  の $\beta$ -ガラクトシダーゼ含む発現プラスミドを導入した。各々培養した後、細胞を 100  $\mu\text{l}$  の細胞溶解液(0.1ml of 25 mM Tris-phosphate [pH7.8], 15% glycerol, 2% CHAPS, 1% L- $\alpha$  -phosphatidylcholine, 1% BSA, 4mM EGTA, 8mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM dithiothreitol, 0.4mM APMSF)で溶解した。その後、ルシフェラーゼおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を測定した。

### 2) ルシフェラーゼ活性の測定

20  $\mu\text{l}$  の細胞溶解液に対して 100  $\mu\text{l}$  のルシフェラーゼ基質溶液 (20mM Tris-NaOH [pH7.8], 1.07mM  $(\text{MgCO}_3)\text{Mg}(\text{OH})_2$ , 2.64mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1mM EGTA, 33.3mM DTT, 270 $\mu\text{M}$  Coenzyme A, 470 $\mu\text{M}$  Luciferin-potassium salt (Molecular Probe), 570 $\mu\text{M}$  ATP)を自動注入後 15 秒間、測定した。それぞれのサンプルに対して、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性に対するルシフェラーゼ活性の比を計算し、培養皿ごとの遺伝子導入効率を補正した。同一の系の実験を 2 穴分、独立に 3 回おこない、その結果の平均と偏差を計算しグラフに表した。

### 3) $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定

20  $\mu\text{l}$  の細胞溶解液に対して 100  $\mu\text{l}$  の $\beta$ -ガラクトシダーゼ基質溶液 (60mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、10mM KCl、1mM  $\text{MgCl}_2$ 、40mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、11mM o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside、43mM  $\beta$ -メルカプトエタノール)を加えて、37 $^\circ\text{C}$ 、20 分間反応させた。反応液が全体に黄色くなったことを確認し、50 $\mu\text{l}$  の 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を加えて反応を停止させた後、O.D 420 で $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

### 4) FGF-2/FGFR inhibitor を用いたレポーター解析

レポータープラスミドを細胞に導入後、FGF-2 を 5、10、50 ng/ml となるように培養液(10% FBS/1% chick serum/DEME)に加えた。細胞を回収する 24 時間前に、FGF レセプターの阻害剤である SU5402 (CALBIOCHEM)を 5、10、20 $\mu\text{M}$  となるように培養液に加えた。

### 5) MEK1/MEK1 inhibitor を用いたレポーター解析

ドミナントアクティブ型 MEK1 は、レポータープラスミドと一緒に培養水晶体に導入した。MEK1 阻害剤である PD98059 はレポータープラスミドを細胞に導入した後、培養液に 100 $\mu$ M の濃度になるように加え、その後細胞を 48 時間培養した。

### (11) 抗体染色

培養細胞を Hanks で 2 回洗浄し、4% PFA/Hnaks を用いて細胞を固定した(4℃、30 分間)。Hanks で 2 回洗浄した後、メタノールに置換し-20℃、15 分間静置した。Hansk で 2 回洗った後、10% Serum/Hnaks で室温、1 時間ブロッキングをおこなった。抗体を含む Hanks バッファーに置き換えて室温、1 時間反応させた後、Hanks バッファーで 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した。2 次抗体を含む Hanks バッファーに置き換えて室温、1 時間反応させた後、Hanks バッファーで 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、DAPI(Vector Laboratories, Inc.)を用いてマウントをおこなった。

抗 L-Maf 抗体 1:1000

抗 $\delta$ -crystallin 抗体 1:1

Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probe), 1:1000

Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probe), 1:1000.

### (12) 大腸菌を用いた融合タンパク質の精製

GST 融合融合タンパク質の調整は主にファルマシアの精製方法に従った。宿主大腸菌として DH5 $\alpha$  株を用いた。各発現プラスミドをもつ大腸菌を 37℃ で終夜培養し、その培養液を 100 倍に希釈して 37℃ で O.D. 600 で 0.6 になるまで培養した(約 3 時間)。その後、培養液に IPTB を 1mM 加えて 37℃、2 時間培養した。その後大腸菌を破碎バッファー(140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)に懸濁し、氷上で超音破碎した(30 秒、4 回)。最終濃度 1%になるように Triton-X 100 を加えて 9,800 回転、4℃、30 分間遠心分離し、上清を大腸菌抽出液とした。その後グルタチオンビーズを充填したカラムに大腸菌抽出液を添加し、破碎液でカラムの洗浄をおこなった。溶出バッファー(50mM Tris-HCl pH8.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 1mMDTT, 20mM 還元グルタチオン)を加えて、サンプルを溶出した(流速 100 $\mu$ l/min)。

### (13) *in vitro* リン酸化解析

精製 GS-L-Maf タンパク質と 50 unit 精製 ERK (New England Biolabs) をカイネースバッファーにて (50mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub> 1mM EGTA, 2mM DTT, 0.11% Brij35, 1mM ATP, 5  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP)、30 °C、3 時間反応させた。その後、SDS-PAGE で展開した。

#### (14) ゲル移動度シフト解析

主に Yoshida らの方法 (Yoshida and Yasuda, 2002) に従った。ゲル移動度シフト解析に用いたプローブとして、5'-CATTTCTGCTGACCACGTTGCCTTC-3' を用いた。2 本鎖にしたプローブの 3' 末端側を Klenow fragment と [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP を用いて標識した。標識した 5 pmol のプローブと 1 pmol の精製 L-Maf タンパク質をもちいて、結合バッファー (10mM Hepes-KOH [pH 7.9], 0.1mM EDTA 2mM DTT, 100mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, BSA, 10% glycerol, 5 $\mu$ g/ $\mu$ l poly(dI-dC)-poly(dI-dC)) にて、30 °C、30 分間反応させた。反応させた混合溶液は 4 % ポリアクリルアミドゲル、定電圧 200V で展開した。泳動バッファーは TG バッファー (20mM Tris, 196mM glycine) をもちいた。ポリアクリルアミドゲルはサンプルを展開する前に室温、定電圧 150V でプレランをおこなった。その後、ゲルを DEAE 紙 (whatman) に移し乾燥した後、フィルムに露光させた。

#### (15) プロテアソーム阻害剤を用いた解析

pEFX-FLAG-L-maf を強制発現させた水晶体細胞を 45 時間培養した後、プロテアソーム阻害剤 (20  $\mu$ g/ml Z-Leu-Leu-Leu-Aldehyde (LLnL; BostonBiochem) 50 $\mu$ M MG132 (BostonBiochem) and 10 $\mu$ M clasto-lactacystin- $\beta$ -lactone (lactastatin; BostonBiochem)) を培養液に加え、さらに 3 時間培養した。野生型 L-Maf と変異型 L-Maf (S65A) の安定性を比較するために、pEFX-FLAG-L-maf WT もしくは pEFX-FLAG-L-maf S65A を導入した水晶体細胞を 45 時間培養した後、プロテアソーム阻害剤 (20  $\mu$ g/ml LLnL) を培養液に加えた。さらに 3 時間培養した後、培養液で細胞を洗浄し、培養液を加えて培養を続けた。

### 第三章 結果

#### 第一節 FGF による水晶体細胞の増殖と分化の制御

##### (1) FGF-2 は水晶体細胞の増殖を促進する

水晶体細胞の増殖と分化は硝子体に含まれる因子により制御されることが知られている(Hyatt and Beebe, 1993)。硝子体の中にはさまざまな増殖因子が含まれることが知られているが、その中でも Fibroblast growth factor (FGF)は硝子体に含まれ、水晶体の増殖と分化を制御する因子として研究が行われている(Schulz et al., 1993) (Jean et al., 1998)。しかしながら FGF シグナルの下流でどのような分子機構が働き、水晶体細胞の増殖や分化を制御しているかは明らかとはなっていない。この分子メカニズムを解析するために、本研究では初代培養水晶体細胞をもちいた。

水晶体細胞をニワトリ胚から摘出し細かく砕いた後、培養し、コンフルエントになった後さらにトリプシンで細かくして培養を続けると、一部の細胞が増殖し、やがて、コンフルエントに達したところから、水晶体繊維細胞に分化し、水晶体様構造を形成することが知られている(Okada et al., 1971) (Menko et al., 1984) (図 3-1)。このことから培養水晶体細胞は、水晶体上皮細胞から繊維細胞への分化を調べる良いモデル系となる。

まず培養水晶体細胞において FGF が水晶体細胞の増殖に関わっているのか調べるために、培養液中に FGF-2 (100 ng/ml)を加えたものと加えないものをそれぞれ培養し、トリプシンで細胞を細かく砕いた後、トリパンブルーで染色し生細胞の細胞数を計測した。

FGF-2 を加えた場合、加えない場合いずれも培養を始めて 1-3 日間、細胞の増殖がみられた(図 3-2)。しかしながら FGF-2 を加えて培養した場合では、1-3 日間、細胞数の増加速度が FGF-2 を加えない場合と比べて速く、3 日目において培養皿の全細胞数が FGF-2 を加えない場合と比べて約 2 倍になることが明らかとなった。培養を始めて 3-6 日間では FGF-2 を加えた場合と加えない場合いずれにおいても、顕著な細胞数の増減はみられなかった。これらのことから、FGF-2 は水晶体細胞の増殖を促進し、その増殖は培養を始めて 1-3 日間でみられることがわかった。

##### (2) FGF-2 は水晶体様構造の形成を促進する

次に水晶体細胞の分化が FGF-2 により影響を受けるのかどうか調べるために、培養液中に FGF-2 を加えて 6 日間培養し、その後水晶体の分化マーカーで

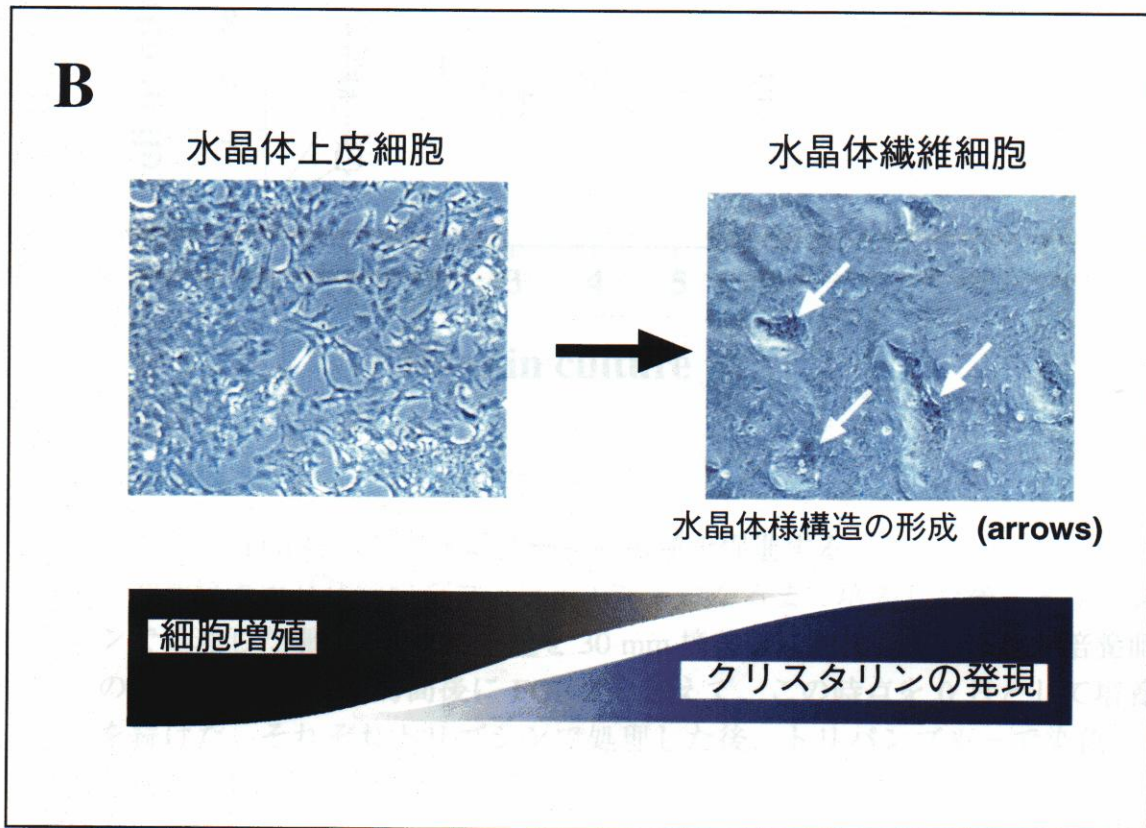
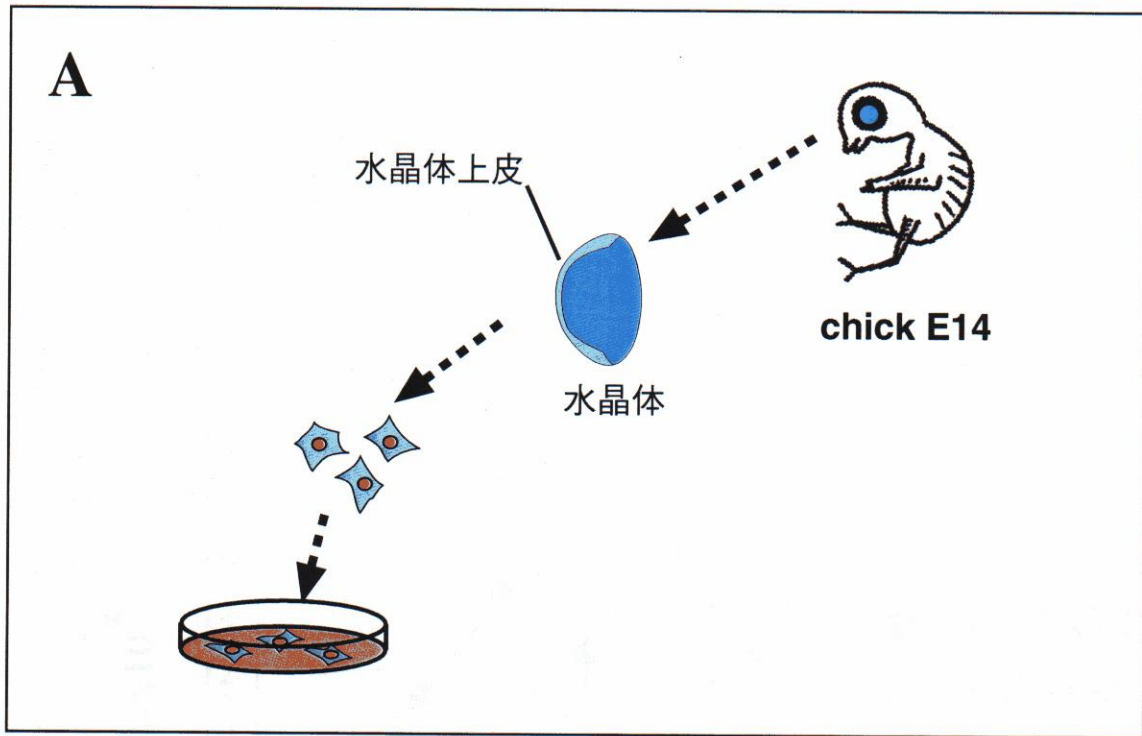


図 3-1 培養水晶体細胞でみられる上皮細胞から繊維細胞への分化  
 (A) ニワトリ胚から水晶体を取り出し細かく砕いた後、培養をおこなった。コンフルエントになった細胞を1度継代したものを実験に用いた。(B) 培養水晶体細胞は最初増殖を繰り返し、細胞が密になったところから、水晶体繊維細胞へと分化し、水晶体様構造を形成する。水晶体様構造の形成に伴い、クリスタリンの発現が増大する。

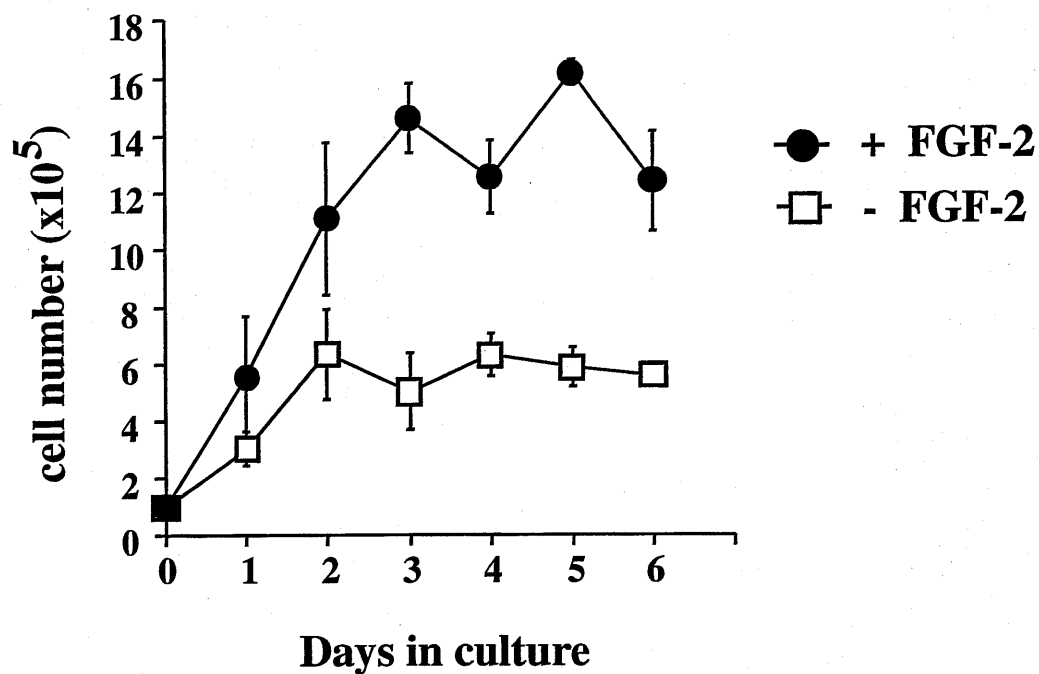


図 3-2 FGF-2 は培養水晶体細胞の増殖を促進する

初代培養水晶体細胞をコンフルエントになるまで培養した後、トリプシンで処理した細胞を  $1 \times 10^5$  細胞を 30 mm 培養皿に継代した。細胞が培養皿の底に接着する 24 時間後に FGF-2 を加えて、この時点をも 0 日として培養を続けた。それぞれトリプシンで処理した後、トリパンブルーで染色し、生細胞の数を数えた。

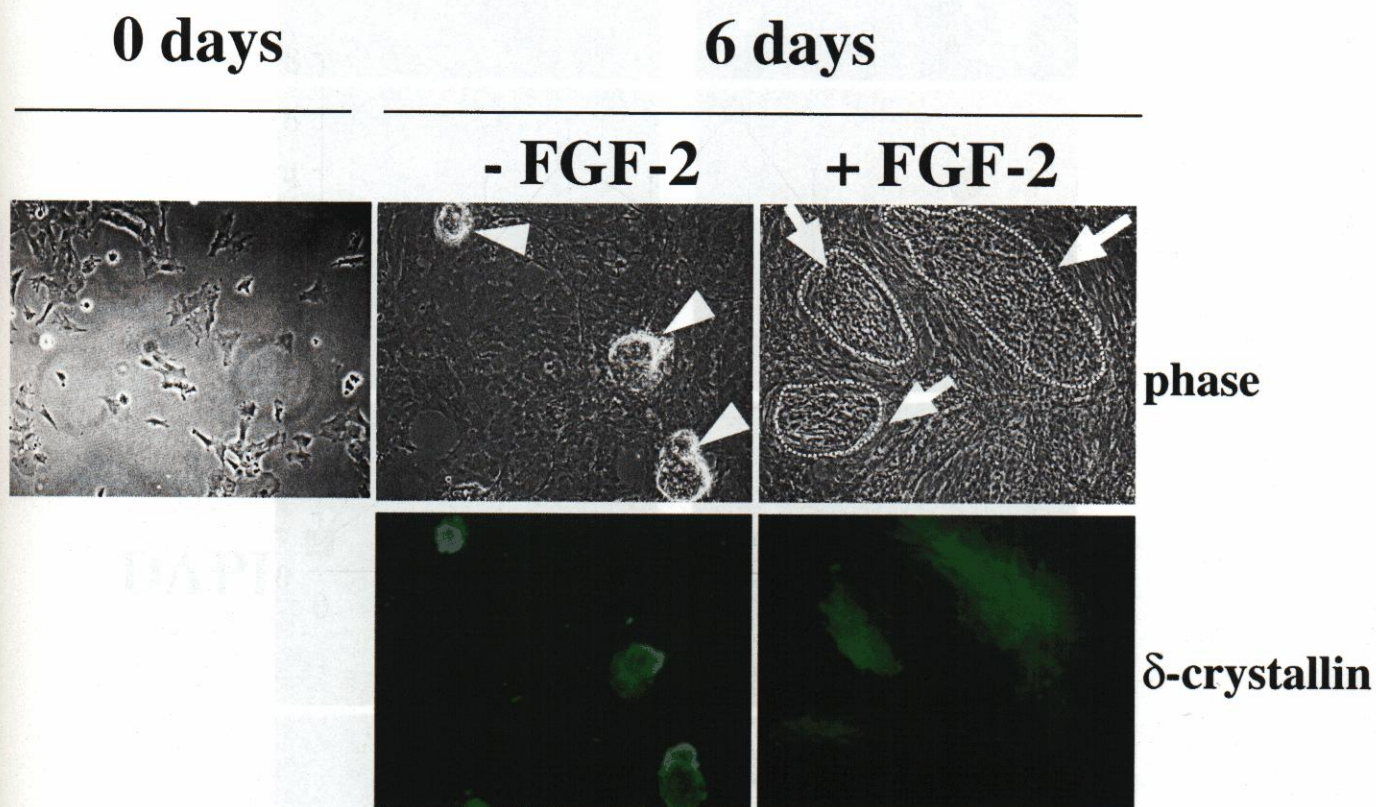


図 3-3 FGF-2 は水晶体様構造の形成を促進する

培養水晶体細胞をに FGF-2 を加えて 6 日間、培養した。その後、細胞を固定し、抗  $\delta$ -クリスタリン抗体を用いて、免疫染色をおこなった (緑)。矢頭は FGF-2 を加えずに細胞を培養したときにみられる水晶体様構造を示す。矢印は FGF-2 の存在下で細胞を培養した場合にみられる水晶体様構造を示す。

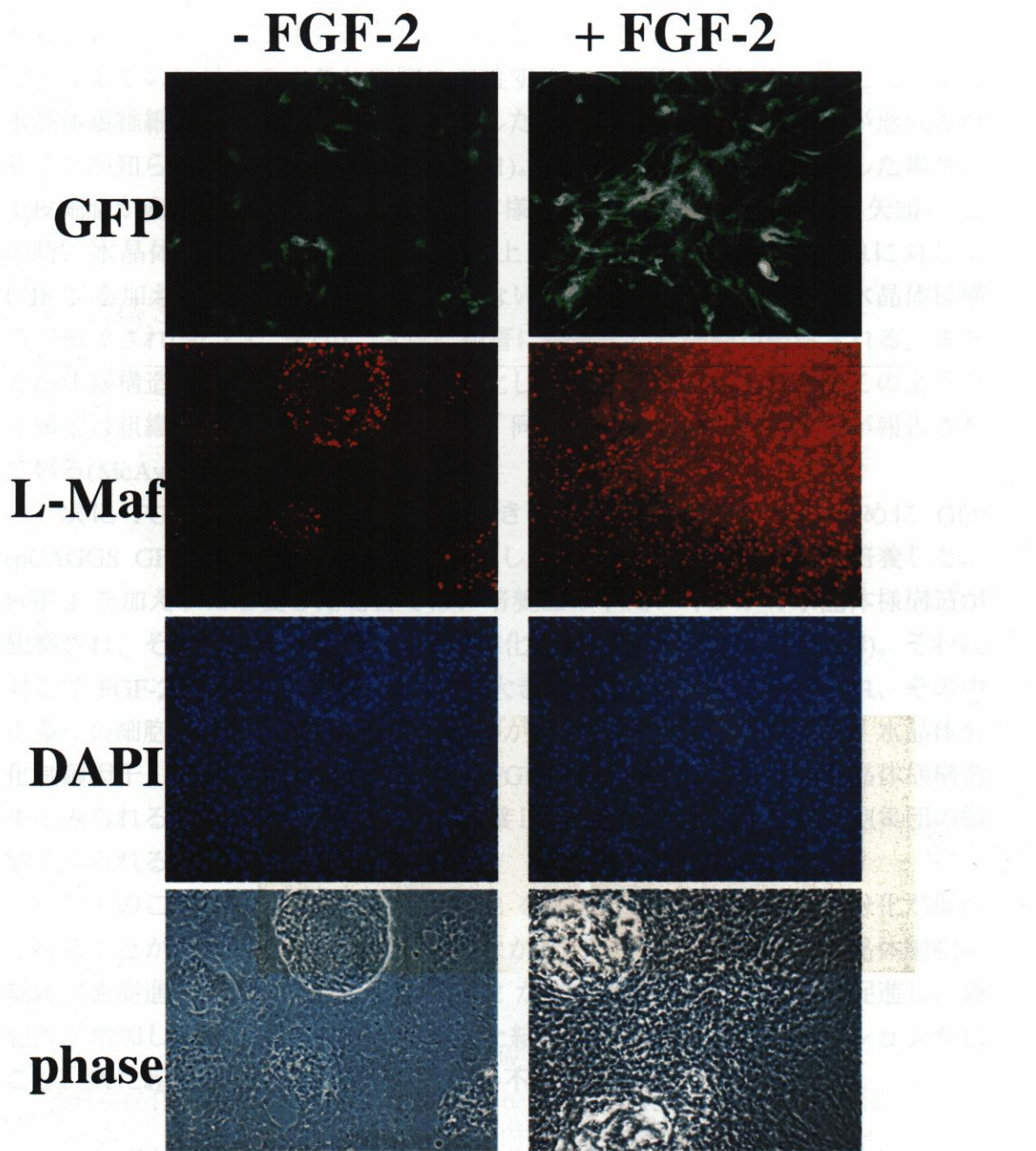


図 3-4 FGF-2 は培養水晶体細胞の繊維化を促進する。

培養水晶体細胞に GFP を導入した後、FGF-2 を加えて 6 日間、培養した。その後、抗体  $\delta$ -クリスタリン抗体 (緑) と抗 L-Maf 抗体 (赤) を用いて、二重免疫染色を行った。 FGF-2 を加えて培養をした細胞では、繊維化した細胞がみられる。

ある $\delta$ -クリスタリンに対する抗体で免疫染色をおこなった。

今までの知見から水晶体細胞を培養すると、細胞が密になったところから水晶体繊維細胞に分化し、そこで分化した細胞からは水晶体様構造が形成されることが知られている(Okada et al., 1971)。FGF-2 を加えないで培養した場合、上皮細胞が密になったところから水晶体様構造が形成される(図 3-3、矢頭)。この時、水晶体様構造の周りでは一層の上皮細胞が観察される。それに対して FGF-2 を加えて培養した場合は、加えない場合と比較して、大きな水晶体様構造が形成され(図 3-3、矢印)、さらに顕著に繊維化した細胞が観察される。また水晶体様構造の周辺では、細胞が多層化していることが観察された。このような多層化は組織培養を用いた実験からも、同様の結果が得られることが報告されている(McAvoy et al., 1999)。

次に FGF-2 を加えて培養したときの細胞形態を観察するために GFP (pCAGGS GFP)を培養水晶体細胞に導入し、FGF-2 を加えて 6 日間培養した。FGF-2 を加えずに培養した場合では、培養皿の中にいくつかの水晶体様構造が観察され、その水晶体様構造の中で繊維化した細胞がみられる(図 3-4)。それに対して FGF-2 を加えて培養した場合、大きな水晶体様構造が観察され、その中の多くの細胞が顕著に繊維化しているのがわかる(図 3-4)。このとき、水晶体分化制御因子 L-Maf タンパク質の発現は FGF-2 を加えない場合では水晶体様構造中にみられる。また FGF-2 を加えて培養した場合では繊維化した細胞集団の領域でみられる。

以上のことから、培養液中に FGF-2 を加えると、水晶体細胞の分化が促進されることが明らかとなった。しかしながら、FGF-2 が直接的に水晶体細胞の繊維化を促進したのか、もしくは FGF-2 がまず水晶体細胞の増殖を促進し、細胞数が増加し細胞と細胞の間が接着した結果、コンタクトインヒビションが起こり、次に起きる分化が促進されたのか不明である。

### (3) FGF はクリスタリンの発現を制御する

水晶体の分化に伴って、クリスタリンと総称される一群の水晶体特異的なタンパク質の発現が増大することが知られている(McAvoy et al., 1999)。これら水晶体特異的な遺伝子の発現が FGF-2 により影響を受けるのか調べるために、FGF-2 を加えて 6 日間培養し、1 日おきに全 RNA を調整しノザンプロット解析を用いてその発現を解析した。

FGF-2 を加えない場合、 $\delta$ -、 $\alpha$ A-、 $\beta$ B1-クリスタリン、フィレンシンのいずれの発現も、1 日目から 6 日目まで徐々に増大することがわかった (図 3-4)。それに対して FGF-2 を加えた場合、培養を始めて 1-2 日の間、 $\delta$ -、 $\alpha$ A-、 $\beta$ B1-

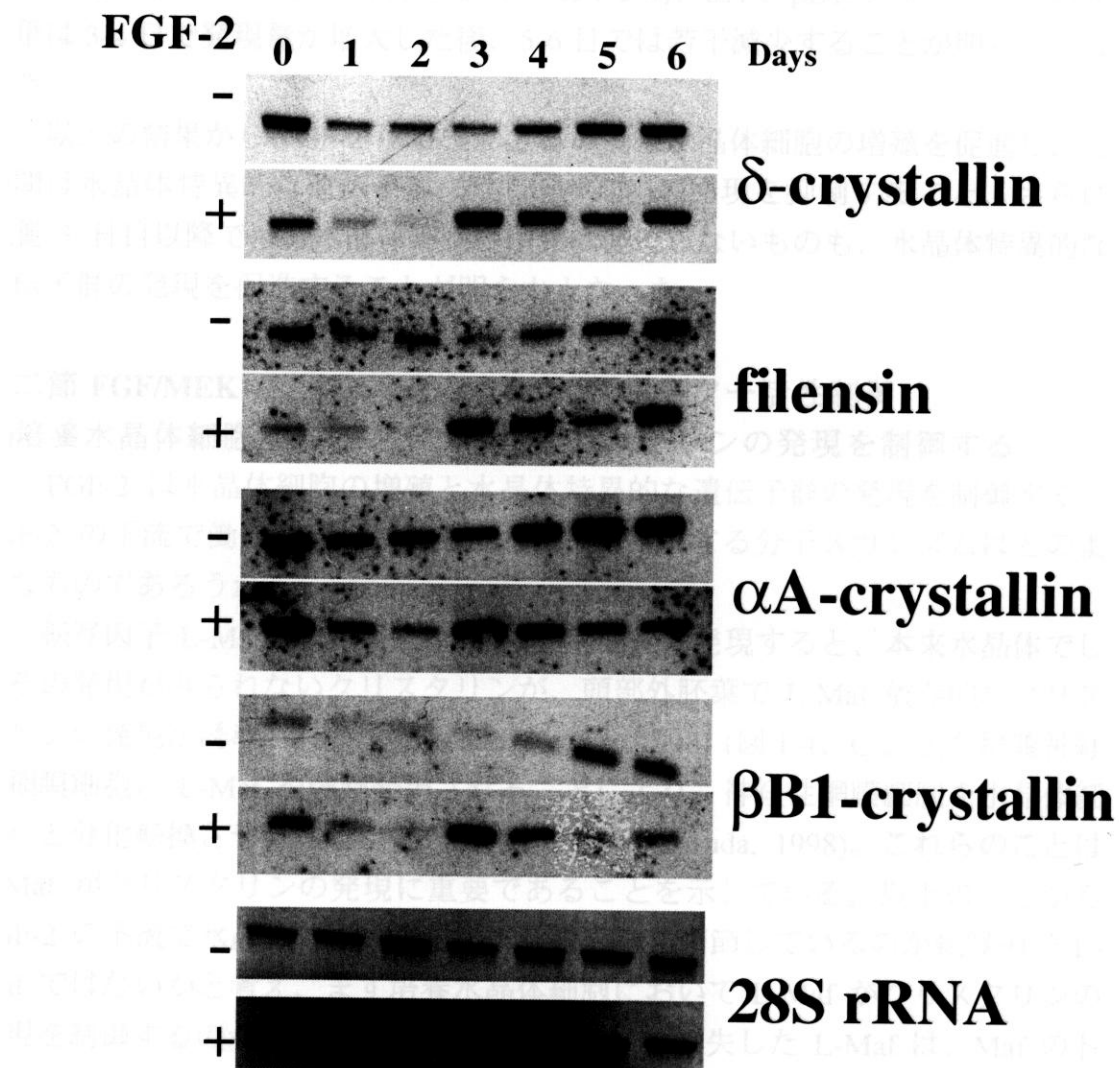


図 3-5 FGF-2 による水晶体特異的な遺伝子の発現制御

水晶体細胞を FGF-2(100ng/ml) の存在下で培養した。その後、全 RNA を回収し、ノザンブロット解析をおこなった。δ-、αA-、βB1- クリスタリンの解析には 0.5μg、フィレンシンの解析には 1μg の全 RNA を用いた。下段に 28S rRNA 像を示す。

クリスタリン、フィレンシンのいずれの発現も FGF-2 を加える前(0 日目)と比較して、減少することが明らかとなった。さらに、 $\delta$ -クリスタリンとフィレンシンの発現量は、培養 3 日目に増大し (図 3-4)、 $\alpha$ A-、 $\beta$ B1-クリスタリンの発現量は 3-4 日で発現量が増大した後、5-6 日では若干減少することが明らかとなった。

以上の結果から FGF-2 は培養 1-2 日の間は水晶体細胞の増殖を促進し、この間は水晶体特異的な遺伝子群(クリスタリン)の発現を抑制すること、さらに培養 3 日目以降では、水晶体細胞の増殖は促進しないものも、水晶体特異的な遺伝子群の発現を促進することが明らかとなった。

## 第二節 FGF/MEK1/ERK による L-Maf のレポーター活性制御

### (1)培養水晶体細胞において L-Maf はクリスタリンの発現を制御する

FGF-2 は水晶体細胞の増殖と水晶体特異的な遺伝子群の発現を制御する。FGF-2 の下流で働き、水晶体の増殖や分化を制御する分子メカニズムはどのようなものであろうか。

転写因子 L-Maf をニワトリ頭部外胚葉に強制発現すると、本来水晶体でしかその発現がみられないクリスタリンが、頭部外胚葉で L-Maf 依存的なクリスタリンの発現が誘導される(Ogino and Yasuda, 1998) (図 1-4, C)。また培養神経性網膜細胞に L-Maf を強制発現させることにより、神経性網膜細胞を水晶体細胞へと分化転換させることができる(Ogino and Yasuda, 1998)。これらのことは L-Maf がクリスタリンの発現に重要であることを示している。以上のことから FGF-2 の下流で水晶体特異的な遺伝子群の発現を調節しているのが転写因子 L-Maf ではないかと考え、まず培養水晶体細胞において L-Maf がクリスタリンの発現を制御するのか調べた。酸性アミノ酸領域を欠失した L-Maf は、Maf のドミナントネガティブ型として働くことが示されている(Reza et al., 2002)。そこでドミナントネガティブ型 L-Maf(DN-L-Maf)を水晶体細胞に強制発現し、48 時間培養した後、全 RNA を調整した。調整した RNA をもちいてノザンプロット解析をおこない、 $\delta$ -、 $\alpha$ A-、 $\beta$ B1-クリスタリン、フィレンシンの発現量を調べた(図 3-6)。その結果、 $\delta$ -、 $\alpha$ A-、 $\beta$ B1-クリスタリン、フィレンシンいずれも、DN-L-Maf により、その発現が抑制された。このことは培養水晶体細胞においても、Maf はクリスタリンの発現を制御していることがわかった。しかしながら DN-L-Maf は他の Maf ファミリーとヘテロダイマーを形成することが可能であると考えられるため、いずれの Maf がクリスタリンの発現制御を担っているのか検討する必要がある。

### (2) FGF-2によるL-Mafレポーター活性の調節

FGF-2によるアクリスタリンの発現調節がL-Mafを介して調節されていることを明らかにするために、酸性領域を欠失したL-Maf(pCAGGS-DN-L-Maf)を導入した細胞に、FGF-2を添加し、48時間培養した。その後、全RNAを回収し、ノザンブロット解析をおこない、アクリスタリンの発現量を調べた。その結果、FGF-2によるアクリスタリンの発現調節がL-Mafを介して調節されていることが示された。

次に、酸性領域を欠失したL-Maf(pCAGGS-DN-L-Maf)を導入した細胞に、FGF-2を添加し、48時間培養した。その後、全RNAを回収し、ノザンブロット解析をおこない、アクリスタリンの発現量を調べた。その結果、FGF-2によるアクリスタリンの発現調節がL-Mafを介して調節されていることが示された。

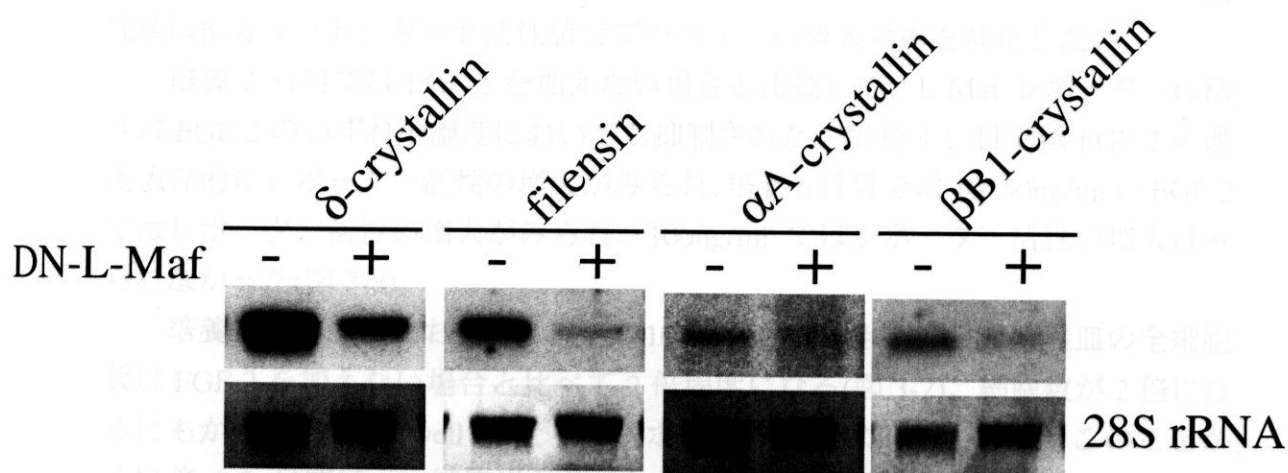


図 3-6 ドミナントネガティブ L-Maf によりクリスタリンの発現阻害

培養水晶体細胞に、酸性領域を欠失した L-Maf(pCAGGS-DN-L-Maf)を導入し、48 時間培養した。その後、全 RNA を回収し、ノザンブロット解析をおこない、水晶体特異的な遺伝子を発現量を調べた。 28S rRNA 像を下段に示す。

### (3) FGF-2はL-Mafレポーター活性を抑制する

水晶体細胞を100%のFGF-2で培養すると、培養48時間後にはアクリスタリンの発現が抑制される。そのためには、FGF-2がL-Mafの活性を抑制し、アクリスタリンの発現を抑制していることが示された。次に、FGF-2によるL-Mafレポーター活性の調節を調べるために、FGF-2を添加した細胞に、L-Maf(pCAGGS-DN-L-Maf)を導入し、48時間培養した。その後、全RNAを回収し、ノザンブロット解析をおこない、アクリスタリンの発現量を調べた。その結果、FGF-2によるL-Mafレポーター活性の調節がL-Mafを介して調節されていることが示された。

## (2) FGF-2 による L-Maf レポーター活性の調節

FGF-2 によるクリスタリンの発現調節が L-Maf を介して制御されているのか調べるために、まず $\alpha$ A-クリスタリンのエンハンサー( $\alpha$ CE2)に含まれる L-Maf 結合配列を 6 個とルシフェラーゼ遺伝子を連結した L-Maf レポーター遺伝子を持ちいて(図 3-7)、FGF-2 により L-Maf の活性が調節されているのか調べた。

L-Maf レポーター遺伝子と $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現プラスミドを培養水晶体細胞に導入した後 FGF-2 を加えて培養した。その後、2、4、6 日目にそれぞれ細胞を調整し、ルシフェラーゼ活性を測定した。得られたルシフェラーゼ活性値は $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値でプラスミドの導入効率を補正した。

培養 2 日目では FGF-2 を加えない場合と比較して、L-Maf レポーターの活性は FGF-2 のいずれの濃度においても抑制された。培養 4 日目では FGF-2 の濃度依存的にレポーター活性の増大がみられ、培養 6 日目では 10、50ng/ml の FGF-2 ではレポーター活性の増大がみられ、100ng/ml ではレポーター活性の増大はみられなかった(図 3-8)。

培養水晶体細胞において、FGF-2(100ng/ml)は培養 1-2 日で培養皿の全細胞数は FGF-2 を加えない場合と比べて 2 倍程度になる(図 3-2)。細胞数が 2 倍になるにもかかわらず、1well 当たりのレポーター活性は抑制される。このことから培養 1-2 日間は、1 細胞当たりのレポーター活性は抑制されているものと考えられる。続いて培養 3-6 日の間では FGF-2 を加えた場合は、細胞数は 2 倍程度のまま増減はみられない(図 3-2)。培養 4 日目で L-Maf レポーターの活性は、FGF-2 を加えた場合、なにも処理していない場合と比較して約 2 倍高い活性を示す(図 3-8)。これらの結果から細胞当たりの L-Maf レポーターの活性は FGF-2 により影響を受けていないことが考えられる。6 日間培養した場合は、レポーター活性の促進も抑制もみられないことから、細胞当たりの L-Maf レポーターの活性は FGF-2 により抑制されていることが考えられる。

以上の結果から L-Maf の活性は培養 1-2 日間、FGF-2 により抑制され、培養 4 日目では L-Maf の活性は FGF-2 シグナルによる抑制を受けることなく、水晶体特異的な遺伝子群の発現を促進するものと考えられる。

## (3) FGF-2 は L-Maf レポーター活性を抑制する

水晶体細胞を FGF-2 の存在下で培養すると、培養 1-2 日目では L-Maf レポーターの活性とクリスタリンの発現が抑制される。それでは FGF-2 はどのような分子機構で L-Maf の活性を抑制し、クリスタリンの発現を抑制しているのだろうか。この間に答えるために、FGF-2 による L-Maf レポーター活性の調節機

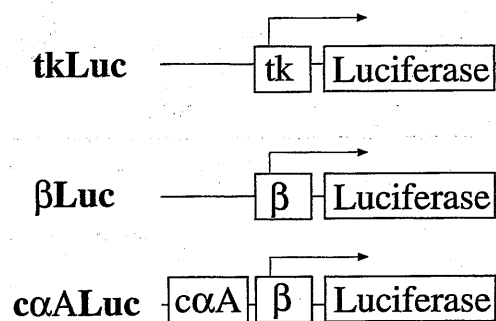


図 3-7 tkLuc、βLuc および L-Maf レポーター (cαALuc)

αA- クリスタリンのプロモーターである αCE2 領域の L-Maf 結合配列を含む 25bp を 6 個連結したものを、β-actin の基本プロモーターと Luciferase 遺伝子上流につないだものを L-Maf レポーター遺伝子として用いた。thymidine kinase 遺伝子のプロモーター (base pairs -197 ~ +56) と Luciferase 遺伝子を連結したものを、外部標準として用いた。

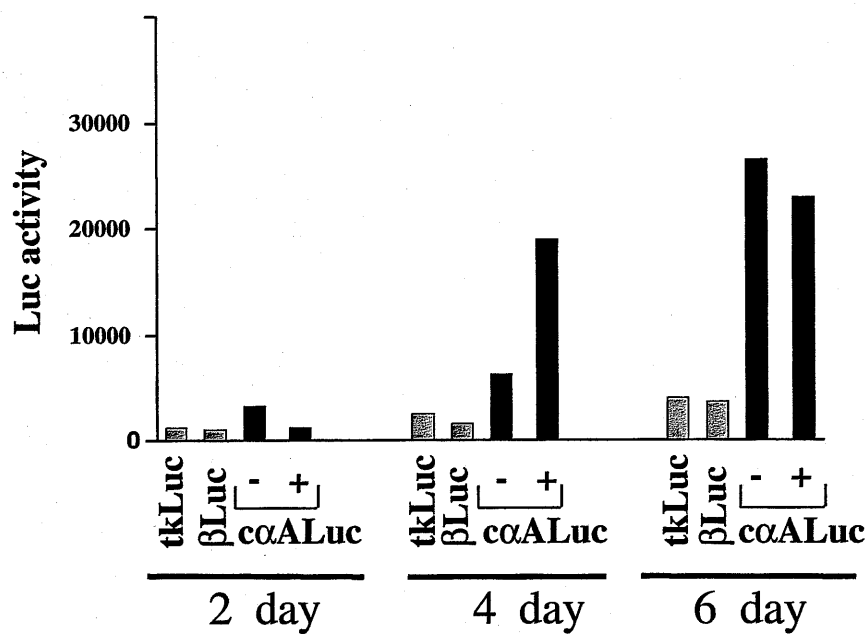


図 3-8 FGF による L-Maf レポーター活性の制御

培養水晶体細胞に L-Maf レポータープラスミド (cαALuc) を導入し、FGF-2 (100 ng/ml) を加えて、それぞれの時間培養した。細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。プラスミドの導入効率を補正するためにルシフェラーゼ活性を β-gal 活性で補正した。

構について解析をおこなった。L-Maf レポーター遺伝子を培養水晶体細胞に導入し FGF-2(5、10、50ng/ml)を加えて 48 時間培養した。その後それぞれの細胞を調整し、ルシフェラーゼ活性を測定した。得られたルシフェラーゼ活性値は  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値でプラスミドの導入効率を補正した。その結果 L-Maf のレポーター活性は FGF-2 の濃度依存的に抑制された(図 3-9、A)。

次に FGF シグナルを阻害した場合に L-Maf レポーターの活性が影響をうけるのか調べるために FGFR の阻害剤である SU5402 を用いて解析をおこなった。レポーター遺伝子を培養水晶体細胞に導入後、24 時間培養し、培養液中に SU5402(5、10、20  $\mu$ M)を加え、さらに 24 時間培養した。その後ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、L-Maf レポーター活性の増大がみられた(図 3-9、B)。FGF-2 による抑制がレポーター遺伝子の発現に用いた基本プロモーター( $\beta$ -actin basal promoter)を介したものでないことを調べるために、 $\beta$ Luc レポーター遺伝子を細胞に導入し FGF-2 を加えて培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した(図 3-9、C)。その結果、 $\beta$ -actin の基本プロモーターは FGF により影響を受けないことがわかった。

以上のことから FGF シグナルは L-Maf レポーター活性を抑制することがわかった。

#### (4) 培養水晶体細胞における FGF による ERK 活性の制御

次に FGF-2 がどのような細胞内情報伝達経路を介して L-Maf レポーターの活性を制御するのか調べた。水晶体分化において FGF シグナルの下流で Extracellular-signal regulated kinase (ERK)が働くことが示されている(Govindarajan and Overbeek, 2001) (Lovicu and McAvoy, 2001)。そこでまず、培養水晶体細胞において FGF-2 が ERK のリン酸化を制御するのか調べた。水晶体を培養するための血清中には増殖因子が含まれる。FGF-2 に依存した ERK の活性を検出するために、2 日間培養した水晶体細胞を無血清培地で 4 時間培養し、FGF-2 (50 ng/ml)を加えて 1 時間さらに培養した。FGF-2 を加える 1 時間前に MEK1 の阻害剤である PD98059 (100  $\mu$ M)を加えた。細胞抽出液を調整した後、抗リン酸化 ERK 抗体と抗 ERK 抗体をもちいてウエスタンブロッティング解析をおこなった。FGF-2 未処理の場合では、弱いリン酸化型 ERK が検出される(図 3-10、レーン 1)。それに対して FGF-2 を加えて培養したときには、ERK のリン酸化が増大することがわかった(図 3-10、レーン 2)。さらに PD98059 を加えて培養した場合には ERK のリン酸化はみられない(図 3-10、レーン 3)。以上の結果から、培養水晶体細胞においても FGF-2 は MEK1 を介して ERK のリン酸化を促

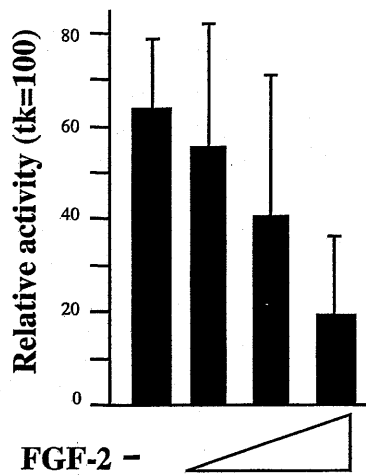
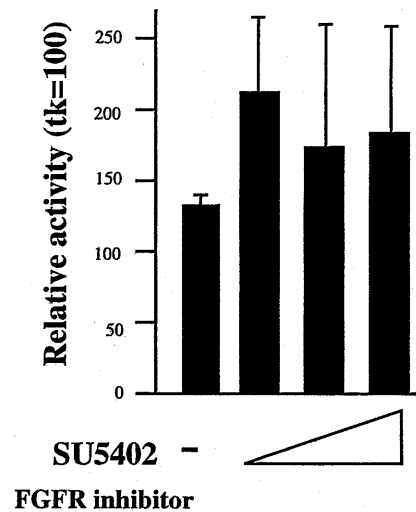
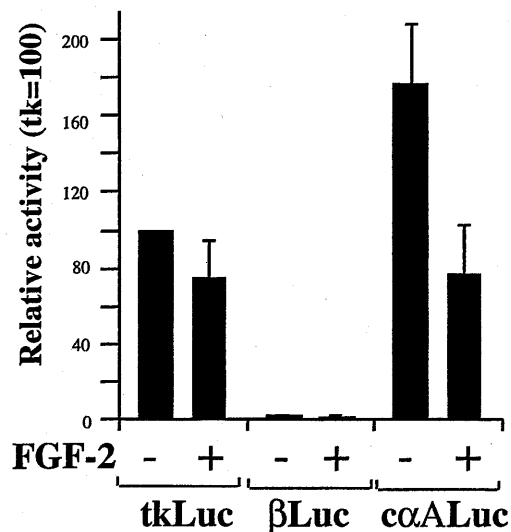
**A****B****C**

図 3-9 FGF-2 は L-Maf レポーター活性を抑制する

(A) レポータープラスミドを培養水晶体細胞に導入後、FGF-2 をそれぞれ 5、10、50 ng /ml となるように加えて、48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性を  $\beta$ -gal 活性で補正し、各ルシフェラーゼ活性は tkLuc の活性を 100 とし相対活性で表している。(B) レポータープラスミドを培養細胞に導入後、24 時間培養し、FGF レセプターの阻害剤である SU5402 をそれぞれ 5、10、20 $\mu$ M となるように培養液中加入して、さらに 24 時間培養した。その後細胞を調整し、ルシフェラーゼ活性を測定した。(C) それぞれのレポータープラスミドを pEFX $\beta$ gal と共に培養水晶体細胞に導入し (300 ng/well)、FGF-2 を加えて (50 ng/ml) 培養した。48 時間後ルシフェラーゼ活性を測定した。

| FGF-2   | -                  | + | + |
|---------|--------------------|---|---|
| PD98059 | -                  | - | + |
|         |                    |   |   |
|         | <b>anti- P-ERK</b> |   |   |
|         |                    |   |   |
|         | <b>anti-ERK</b>    |   |   |

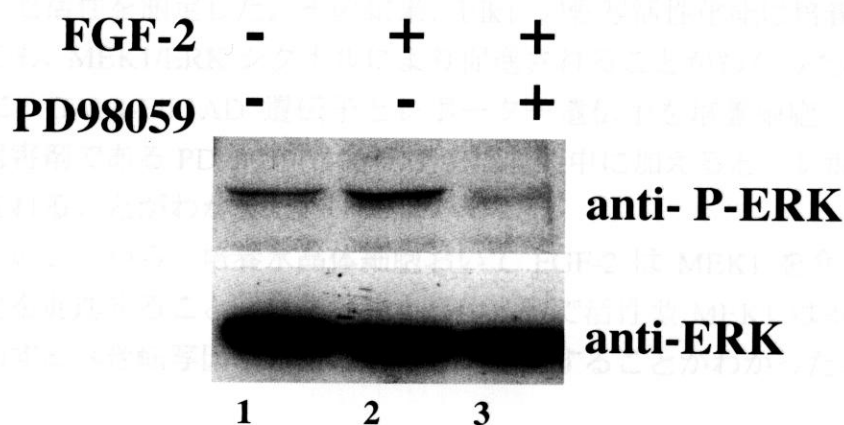


図 3-10 培養水晶体細胞において FGF-2 は ERK のリン酸化を促進する

培養水晶体細胞を4時間、無血清培地で培養した後、FGF-2 (50 ng/ml) を加えて1時間培養した。FGF-2 を加える1時間前に MEK1 の阻害剤である PD98059 (100 $\mu$ M) を加えた。FGF-2 で1時間刺激をした後、細胞を回収して、抗 ERK 抗体および抗リン酸化 ERK 抗体をもちいて、ウエスタンブロット解析をおこなった。FGF-2 を加えない場合、弱いリン酸化型 ERK が検出されるが (レーン 1)、FGF-2 を加えることにより、ERK のリン酸化が促進される (レーン 2)。また、ERK のリン酸化は PD98059 により阻害される (レーン 3)。

進できることがわかった。次に MEK1/ERK シグナルが L-Maf レポーターの活性を調節できるのか調べた。まず培養水晶体細胞において MEK1/ERK シグナルが転写因子の活性を調節できるのか調べた。転写因子 Elk1 は MEK1/ERK により、転写活性化ドメインがリン酸化され、その転写活性化能が増大することが報告されている(Marais et al., 1993)(図 3-11、A)。この Elk1 の転写活性化ドメインと出芽酵母の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインを融合した遺伝子(GAL4-Elk1AD)と活性型 MEK1 および GAL4 の結合配列を 6 個連結したレポーター遺伝子(UAS6 $\beta$ Luc)を培養水晶体細胞に共導入し、48 時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、Elk1 の転写活性化能は培養水晶体細胞においても、MEK1/ERK シグナルにより促進されることがわかった(図 3-11、B)。さらに、GAL4-Elk1AD 遺伝子とレポーター遺伝子を培養細胞に導入後、MEK1 の阻害剤である PD98059 (100  $\mu$ M)を培養液中に加えると、レポーター活性が抑制されることがわかった。

これらのことから、培養水晶体細胞において FGF-2 は MEK1 を介して ERK のリン酸化を促進すること、また培養水晶体細胞で活性型 MEK1 は本来、転写を正に調節すべき転写因子の活性を正しく制御することがわかった。

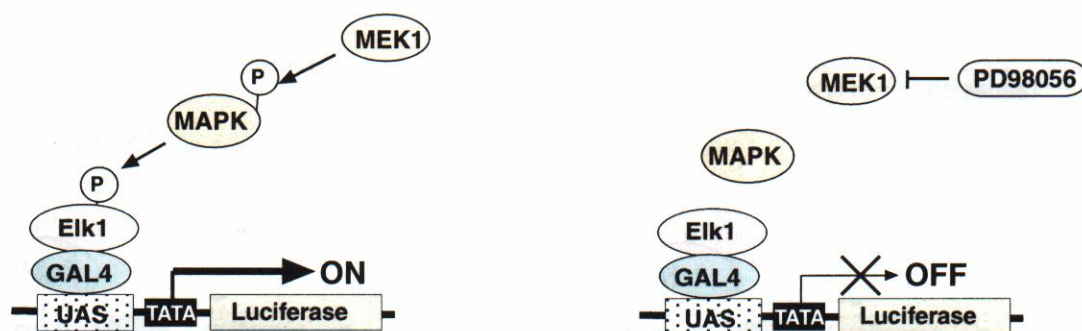
#### (5) 内在性の Maf による L-Maf レポーター活性の抑制

L-Maf レポーターの活性は FGF-2 により抑制されことから、次に L-Maf レポーターの活性が MEK1/ERK シグナルにより調節をうけるのか調べた。L-Maf レポーター遺伝子と活性型 MEK1 を培養細胞に導入し、48 時間培養した後ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、活性型 MEK1 を導入した場合、L-Maf レポーターの活性は抑制された(図 3-12、B)。また、L-Maf レポーター遺伝子を導入後、MEK1 の阻害剤である PD98059 (100  $\mu$ M)を加えた場合、L-Maf レポーターの活性は増大した。次にレポーター活性の抑制が、*L-maf* mRNA の発現を抑制した結果なのか、L-Maf タンパク質の機能を抑制した結果によるものか調べた。まず FGF-2 により *L-maf* mRNA の発現が調節されているのか調べるために、水晶体細胞に FGF-2 (50 ng/ml)を加えて 48 時間培養し、全 RNA を調整した後、ノザンブロット解析をおこなった。その結果、*L-maf* mRNA の発現は FGF-2 により影響を受けないことが明らかとなった(図 3-13)。このことは FGF-2/MEK1/ERK シグナルによる L-Maf レポーター活性の抑制は、L-Maf タンパク質の機能が FGF-2 シグナルにより抑制された結果であることを示している。

**A**

(a) MAPK active (+MEK1)

(b) MAPK inactive (+MEK1 inhibitor : PD98056)



**B**

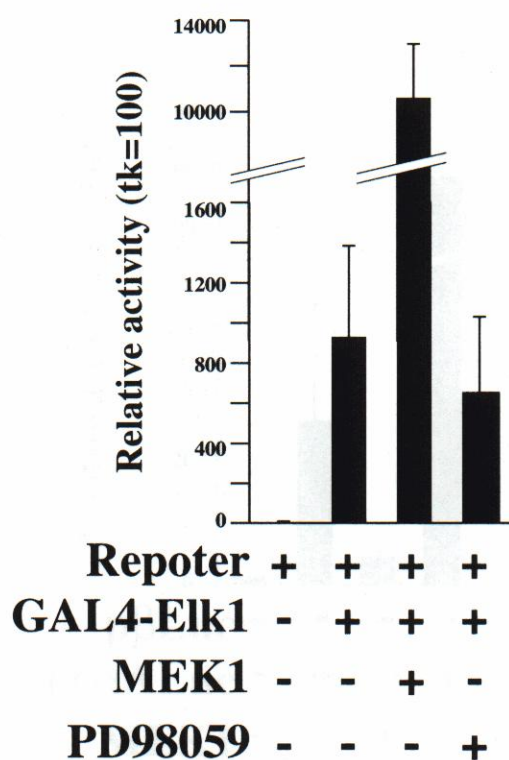
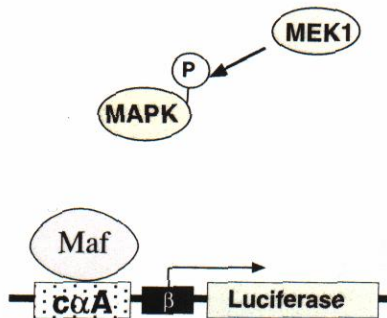


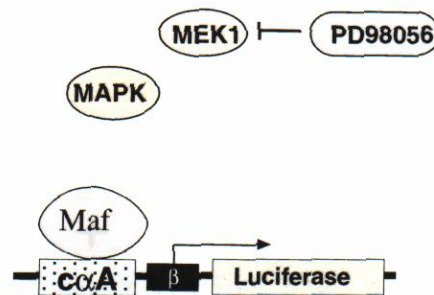
図 3-11 培養水晶体細胞における MEK1/ERK シグナルによる Elk1 の転写活性の調節  
 (A)(a)MEK1 による ERK の活性化を介した転写因子 Elk1 の転写活性化能の促進の模式図。  
 (b)PD98059 による MEK1 活性の抑制の模式図 (B) 培養水晶体細胞に UAS レポータープラスミド (300 ng/well) と、活性型 MEK1 プラスミドを (75 ng/well)、共導入し、48 時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。各ルシフェラーゼ活性は tkLuc の活性を 100 として相対活性で表している。MEK1/ERK シグナルを阻害するために、L-Maf レポータープラスミド (300 ng/well) を細胞に導入後、PD98059 (100 $\mu$ M) 加えて 48 時間培養した。その後ルシフェラーゼ活性を測定した。培養水晶体細胞において、導入した活性型 MEK1 は内在性の ERK のリン酸化を介して Elk1 の転写活性を促進する。また PD98059 は培養水晶体細胞の内在性の MEK1 の活性を阻害し、Elk1 の転写活性化能を抑制する。

**A**

(a) MAPK active (+MEK1)



(b) MAPK inactive (+MEK1 inhibitor : PD98056)



**B**

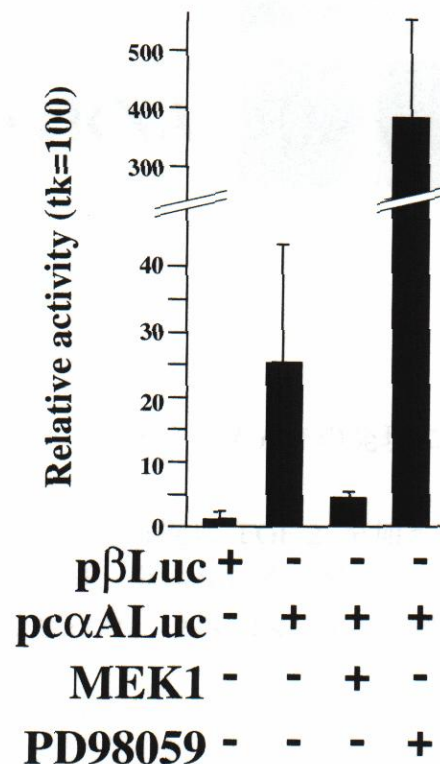


図 3-12 MEK1/ERK シグナルは L-Maf レポーター活性を抑制する

(A)MEK1 による ERK の活性化と PD98059 による MEK1 活性の抑制の模式図

(B) 培養水晶体細胞に L-Maf レポータープラスミド (300 ng/well) と、活性型 MEK1 プラスミドを (75 ng/well)、共導入し、48 時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。各ルシフェラーゼ活性は tkLuc の活性を 100 として相対活性で表している。MEK1/ERK シグナルを阻害するために、L-Maf レポータープラスミド (300 ng/well) を細胞に導入後、PD98059 (100μM) 加えて 48 時間培養した。その後ルシフェラーゼ活性を測定した。

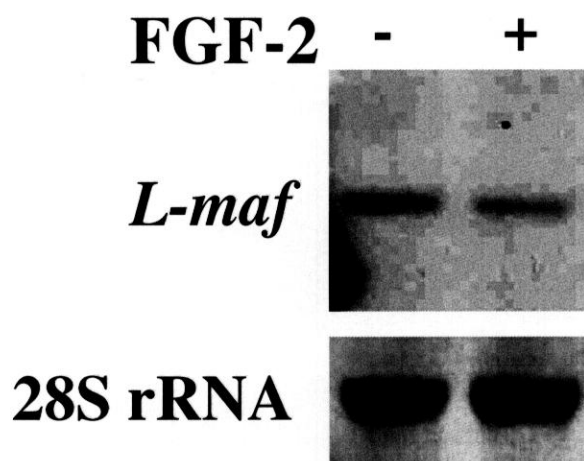


図 3-13 FGF-2 は *L-maf* の発現に影響を与えない

培養水晶体細胞に FGF-2 を加えて、48 時間培養した。その後、全 RNA を調整し、ノザンブロット解析をおこなった。28S rRNA 像を下段に示した。

#### (6) L-Maf の転写活性化能は MEK1/ERK により抑制される

L-Maf のアミノ酸配列を調べたところ、酸性アミノ酸領域に、3 ケ所の MAPK の標的リン酸化配列が存在することがわかった(図 3-14)。さらにこれら 3 ケ所の配列は MafB と c-Maf においても保存されていることがわかった。この酸性アミノ酸領域は転写活性化ドメインとして機能することが v-maf をもちいた解析から明らかとなっている(Kataoka et al., 1996)。このことから、FGF-2/MEK1/ERK シグナルによる L-Maf レポーター活性を抑制が、L-Maf の酸性アミノ酸領域を介して調節されていることが考えられる。そこで、L-Maf タンパク質の機能が MEK1/ERK により抑制されるのか調べた。

まず L-Maf の酸性領域 1-152 a.a.と酵母の転写因子 GLA4 の DNA 領域を融合させた遺伝子を作成した(GAL4- L-MafAD)(図 3-15、A)。L-MafAD-GAL4 遺伝子と活性型 MEK1 及びレポーター遺伝子(UAS6 $\beta$ Luc)を水晶体細胞に導入した後、48 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、L-Maf の転写活性化能は活性型 MEK1 により抑制された(図 3-15、B)。また GAL4-L-MafAD 遺伝子とレポーター遺伝子の水晶体細胞に導入した後、MEK1 の阻害剤である PD98059 (100  $\mu$ M)を加えた場合、L-Maf の転写活性化能は促進された。

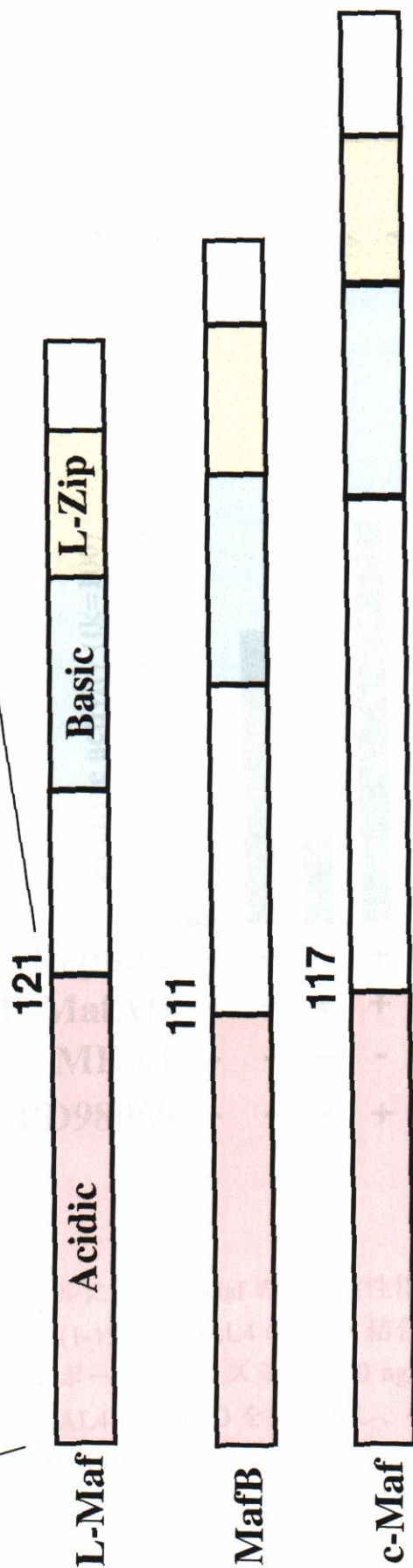
以上のことから FGF-2/MEK1/ERK シグナルは L-Maf の転写活性化領域を介して、その活性を抑制できることが明らかとなった。

#### (7) ERK により L-Maf の Thr57 と Ser65 がリン酸化される

L-Maf の酸性アミノ酸領域もちいた実験から、L-Maf の転写活性化能は MEK1/ERK に抑制されることがわかった。では L-Maf は ERK により直接リン酸化されるのだろうか。L-Maf タンパク質が ERK により直接リン酸化されるのか調べるために、大腸菌から精製した GST 融合 L-Maf タンパク質と精製 ERK をもちいて、*in vitro* リン酸化解析をおこなった。その結果、L-Maf タンパク質は ERK によりリン酸化されることが明らかとなった(図 3-16、A)。またタンパク質量を確認するために抗 GST 抗体をもちいてウエスタンブロッティング解析をおこなった。

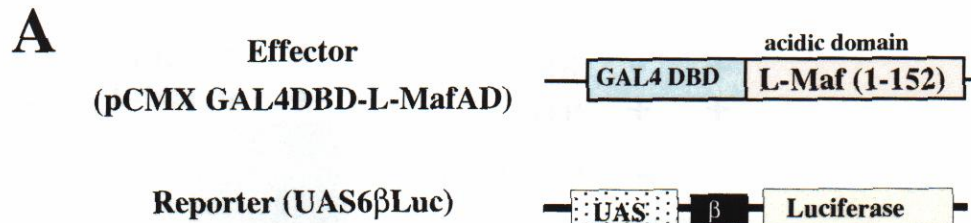
次に L-Maf の酸性アミノ酸領域に存在する MAPK の標的リン酸化配列のうち、いずれの配列が ERK の標的になるのか調べるために、それぞれの配列中の Ser もしくは Thr を Ala に置換した変異型 L-Maf を作成した (それぞれ S14A、T57A および S65A)(図 3-16、B)。これら変異型 L-Maf を大腸菌で発現させ精製した GST 融合 L-Maf タンパク質をもちいて *in vitro* リン酸化反応をおこなった。その結果、Ser14 番目を Ala に置換した L-Maf では、野生型と同様のリン酸化がみられた(図 3-16、C)。しかしながら、Thr57 番目と Ser65 番目を Ala に置換

<sup>1</sup>  
**L-Maf** MASELAM-TAELPTSP LAIEYVNDFDLMKFVKKEPAE-AERL---CHRL-PAGSLSSTPLSTP CSSVPSSP SFCAPSPG (74)  
**MafB** MAGELSI-GAELPTSP LAMEYVNDFDLMKFVKKEPSGRNDRSGRCHTRLQPA GSVSSTPISTP CSSVPSSP SF---SPT (75)  
**c-Maf** MASELAMSGSDLPTSP LAMEYVNDFDLMKFVKKEPVE-TDRIISQCGRLIAGGSLSTPMSTP CSSVPSP SFSAPSPG (79)



MAPK の標的リン酸化配列  
 PXXS/TP PXS/TP

図 3-14 Maf ファミリーで保存されている MAPK 標的リン酸化配列  
 Maf ファミリーの酸性アミノ酸領域には、MAPK によってリン酸化されると考  
 えられる配列が 3 ケ所存在する。図中の数字は L-Maf の開始メチオニンを 1 と  
 した。Acidc: 酸性アミノ酸領域 (転写活性化領域) Basic: 塩基性アミノ酸領域  
 (DNA 結合領域) L-Zip: ロイシンジッパー (ダイマー形成)



**B**

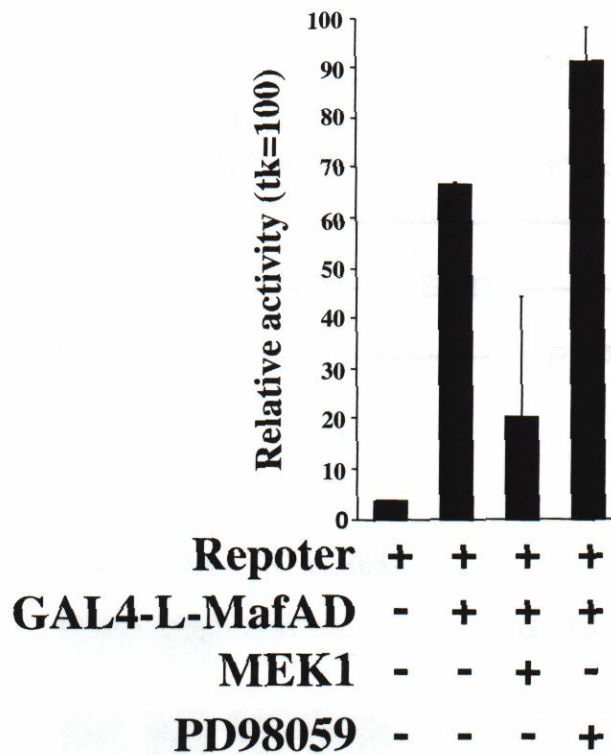
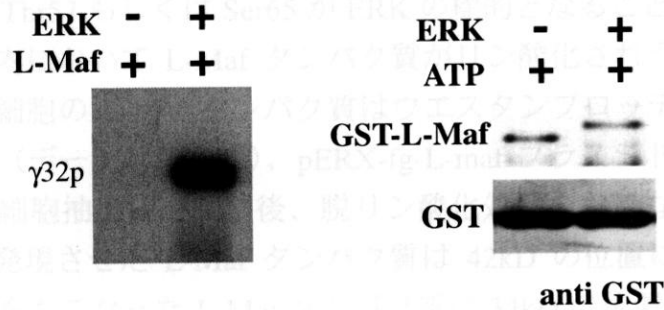


図 3-15 MEK1/ERK シグナルによる L-Maf の転写活性化能の抑制

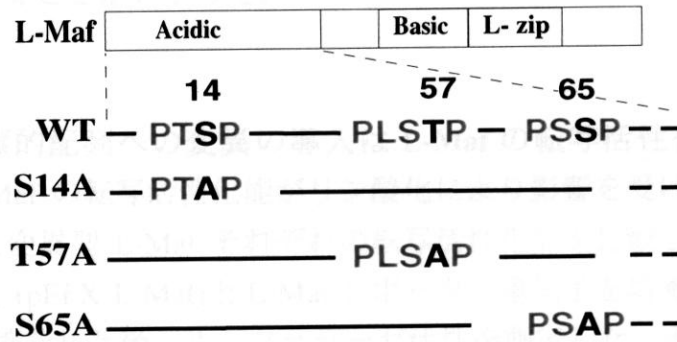
(A) L-Maf の酸性アミノ酸領域 (1-152) を GAL4 の DNA 結合ドメインに融合させた。

(B) 培養水晶体細胞に UAS レポータープラスミド (300 ng/well) と、活性型 MEK1 プラスミドを (75 ng/well) および GAL4-L-MafAD を共導入し、48 時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。MEK1/ERK シグナルを阻害するために、L-Maf レポータープラスミド (300 ng/well) を細胞に導入後、PD98059 (100 $\mu$ M) 加えて 48 時間培養した。その後ルシフェラーゼ活性を測定した。

**A**



**B**



**C**

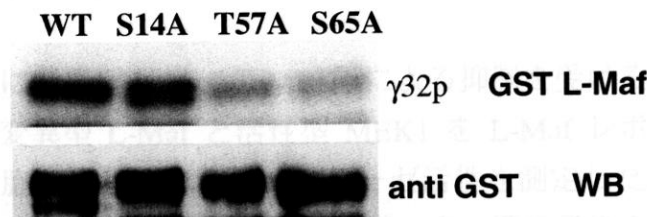


図 3-16 ERK により L-Maf の Thr57 と Ser65 がリン酸化される

(A) GST-L-Maf と精製リン酸化型 ERK(NEB) をもちいて、*in vitro* リン酸化反応をおこなった。右のパネルに抗 GST 抗体をもちいたウエスタンブロット解析の結果を示す。  
(B) GST-L-Maf タンパク質とその変異型の模式図。L-Maf の酸性アミノ酸領域に存在する推定リン酸化配列のセリン / スレオニンアラニンに置換した。図中の数字は L-Maf の開始メチオニンを 1 とした。標的配列中のセリン / スレオニン残基数を示す。L-zip; Leucine Zipper (C) 変異型 L-Maf をもちいて、*in vitro* リン酸化反応をおこなった。下段に抗 GST 抗体をもちいたウエスタンブロット解析の結果を示す。

した場合、野生型と比べて弱いリン酸化しかみられなかった(図 3-16、C)。これらのことから Thr57 もしくは Ser65 が ERK の標的となることがわかった。

次に細胞内において L-Maf タンパク質がリン酸化されうるのか調べた。培養した水晶体細胞の L-Maf タンパク質はウエスタンブロッティングにより検出されないため(データは示さず)、pERX-fg-L-maf プラスミドを COS7 細胞に強制発現させ、細胞抽出液を調整後、脱リン酸化処理をおこなった。その結果、COS7 に強制発現させた L-Maf タンパク質は 42kD の位置に検出されるが、脱リン酸化処理をおこなった L-Maf タンパク質は 34kD の位置に検出される(図 3-17)。ウサギ網状赤血球の抽出液をもちいて *in vitro* で翻訳した L-Maf の場合、34kD の位置に検出される。この結果から、L-Maf タンパク質は細胞内においてリン酸化されることがわかった。

#### (8) MAPK 標的配列への変異の導入は L-Maf の転写活性化能を促進する

次に L-Maf の転写活性化能がリン酸化により影響を受けるのか調べるために、野生型と変異型 L-Maf それぞれの転写活性化能を比較した。野生型および変異型 L-Maf (pEFX L-Maf) と L-Maf レポーター遺伝子を培養水晶体細胞に導入し、48 時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、T57A と S65A は野生型と比べて、5-7 倍高い活性を示した(図 3-18、A)。このことは、リン酸化を受けない L-Maf は高い転写活性化能をもつことを示している。これは変異型 L-Maf が MEK1/ERK シグナルにより抑制を受けなくなったためと考えられる。

そこで次に変異型 L-Maf が MEK1 による抑制を受けるのかどうか調べた。野生型および変異型 L-Maf と活性型 MEK1 を L-Maf レポーター遺伝子と共に培養水晶体細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。培養水晶体細胞には内在性の L-Maf が存在するので、レポーター遺伝子のみを導入した場合にも活性がみられる。そこに活性型 MEK1 を強制発現させると、レポーター活性は抑制される。野生型 L-Maf を強制発現させた場合レポーター活性が増大し、さらにそこに活性型 MEK1 を導入すると、その活性は抑制される(図 3-18、B)。変異型 L-Maf を強制発現すると、レポーター活性は野生型の場合と比較して高い活性を示す。ここに MEK1 を共導入すると、MEK1 を導入しない場合と同程度のレポーター活性を示す。レポーター活性が若干、減少しているのは、内在性の L-Maf の活性が抑制されたためと考えられる。これらのことは変異型 L-Maf は MEK1 による抑制を受けないことを示している。

神経性網膜細胞に L-Maf を強制発現させると、水晶体特異的な遺伝子の発

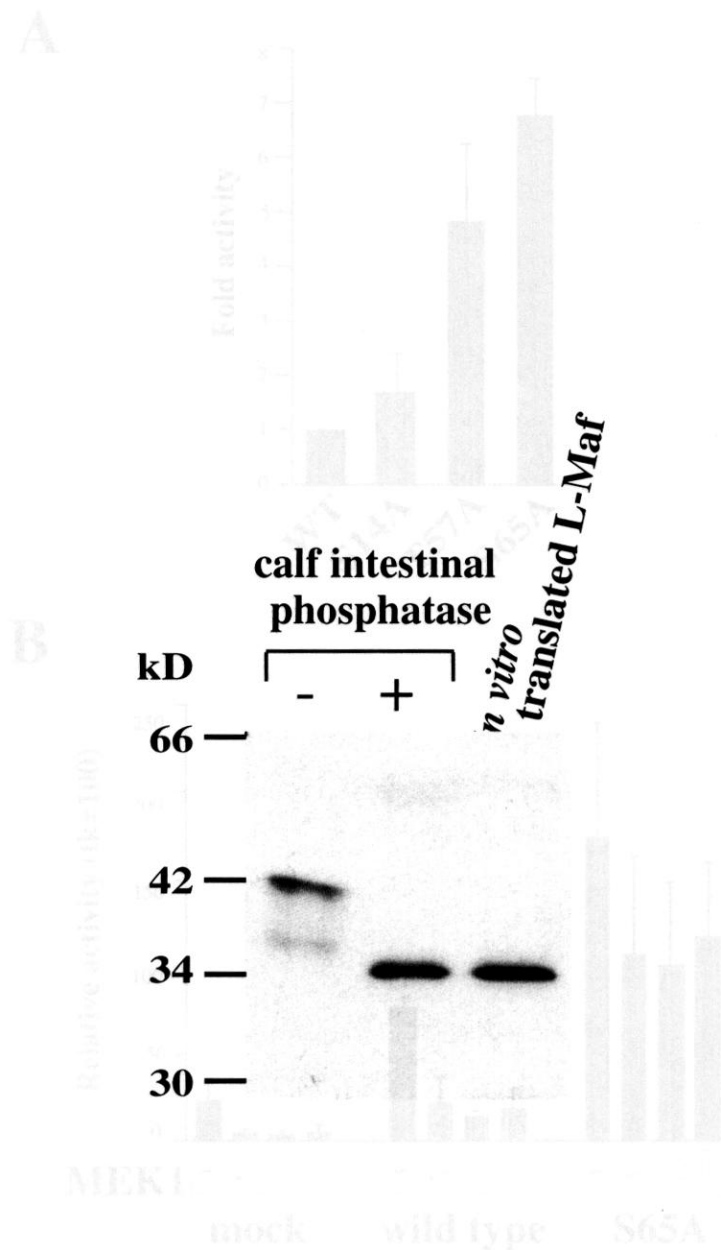


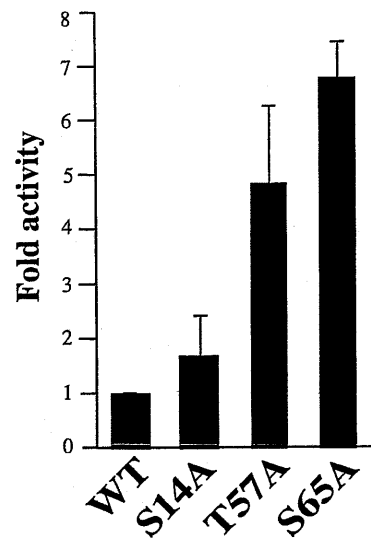
図 3-17 COS7 細胞で L-Maf はリン酸化される

pEFX-fg-L-Maf を COS7 細胞に導入した後、核タンパク質を調整した。その後 calf intestinal phosphatase を用いて脱リン酸化処理を行い、抗 FLAG 抗体をもちいてウエスタンブロット解析をおこなった。

(A) pEFX-fg-L-Maf と L-Maf のリン酸化を測定した。pEFX-fg-L-Maf を COS7 細胞に導入し、48 時間培養後、リン酸化酵素活性を測定した。プラスミドの導入効率を補正するために、リン酸化酵素活性を B-gal 活性で補正し、各リン酸化酵素活性は pEFX-fg-L-Maf の活性を 100 とし、相対活性で表した。

(B) 野生型および変異型 L-Maf 発現プラスミド (pEFX-L-Maf, 5 ng/well) と活性化型 MEK1 発現プラスミド (S218/222E Δ 33-5, 20, 50, 75 pg/well) を培養本細胞細胞に導入し、48 時間培養後、リン酸化酵素活性を測定した。各リン酸化酵素活性は MEK1 の活性を 100 とし、相対活性で表している。

**A**



**B**

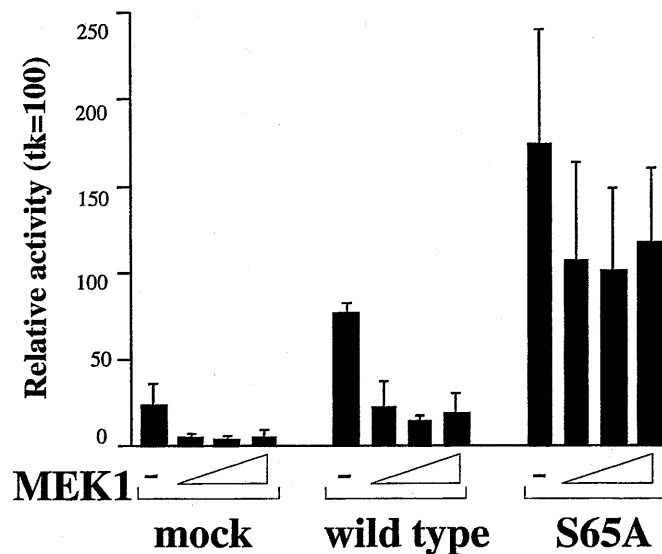


図 3-18 変異型 L-Maf は野生型 L-Maf より高い転写活性化能をもつ

(A) 野生型および変異型 L-Maf 発現プラスミド (pEFX-L-maf, 5 ng/well) と L-Maf レポータープラスミド (c $\alpha$ ALuc, 300 ng/well) を培養水晶体細胞に導入し、48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。プラスミドの導入効率を補正するためにルシフェラーゼ活性を  $\beta$ -gal 活性で補正し、各ルシフェラーゼ活性は pEFX-L-Maf の活性を 1 とした相対活性で表した。

(B) 野生型および変異型 L-Maf 発現プラスミド (pEFX-L-Maf, 5 ng/well) と活性化型 MEK1 発現プラスミド (S218/222E  $\Delta$  32-5, 20, 50, 75 ng/well) を培養水晶体細胞に共導入し、48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。各ルシフェラーゼ活性は tkLuc の活性を 100 とした相対活性で表している。

現を誘導し、水晶体細胞へと分化転換することが知られている(Ogino and Yasuda, 1998)。次に L-Maf のリン酸化がクリスタリン遺伝子の発現に関与するのか調べた。培養神経性網膜細胞に野生型および変異型 L-Maf (pEFX L-Maf)を強制発現し 48 時間培養した後、細胞を固定して抗 $\delta$ -クリスタリン抗体をもちいて免疫染色をおこない、 $\delta$ -クリスタリン陽性細胞数を測定した。その結果、変異型 L-Maf を強制発現させたときに、野生型と比較して、2-3 倍の $\delta$ -クリスタリン陽性細胞がみられた (図 3-19、表 1)。

以上の結果から、野生型の L-Maf は ERK によりリン酸化を受けることによりその機能が抑制され、このリン酸化を受けない場合に、標的遺伝子であるクリスタリンの発現を活性化するものと考えられる。

### 第三節 L-Maf の活性におけるリン酸化の役割

#### (1) L-Maf の DNA 結合活性はリン酸化により影響を受けない

それでは ERK のリン酸化により L-Maf の機能はどのような制御を受けるのであろうか。現在までに転写因子がリン酸化されると、DNA 結合活性や転写活性化能、タンパク質の安定性の変化、細胞内局在の変化、co-activator や repressor など相互作用する分子との結合活性が変わることが報告されている(Shaywitz and Greenberg, 1999)。

そこでまずリン酸化により L-Maf の標的配列への結合活性が影響を受けるのか調べた。大腸菌で GST 融合 L-Maf タンパク質を発現させ精製した後、GST 領域を切断した。この精製 L-Maf タンパク質もちいて *in vitro* でリン酸化反応をおこなった。プローブとして $\alpha$ A-クリスタリンのエンハンサー $\alpha$ CE2 の L-Maf 結合配列を含む領域( $\alpha$ A)を用いて、ゲル移動度シフトアッセイをおこなった。その結果、ERK によりリン酸化を受けていない L-Maf(レーン 2)とリン酸化を受けた L-Maf(レーン 3)の結合活性は同程度であることがわかった。(図 3-20、A)。次に変異型 L-Maf が野生型と同様に標的配列へ結合能を有しているのか調べるために、網状赤血球の抽出液で調整した L-Maf を用いてゲル移動度シフト解析をおこなった(図 3-20、B)。その結果、変異型 L-Maf は野生型の L-Maf と同様に標的配列に結合できることがわかった。また、変異型 L-Maf の標的配列への結合活性は、リン酸化反応により影響を受けないことを確認している(図 3-20、C)これらのことは ERK のリン酸化は L-Maf の標的配列への結合に影響を与えないことを示している。また変異型 L-Maf は野生型 L-Maf と同様に核内に存在することを確認している(図 3-21)

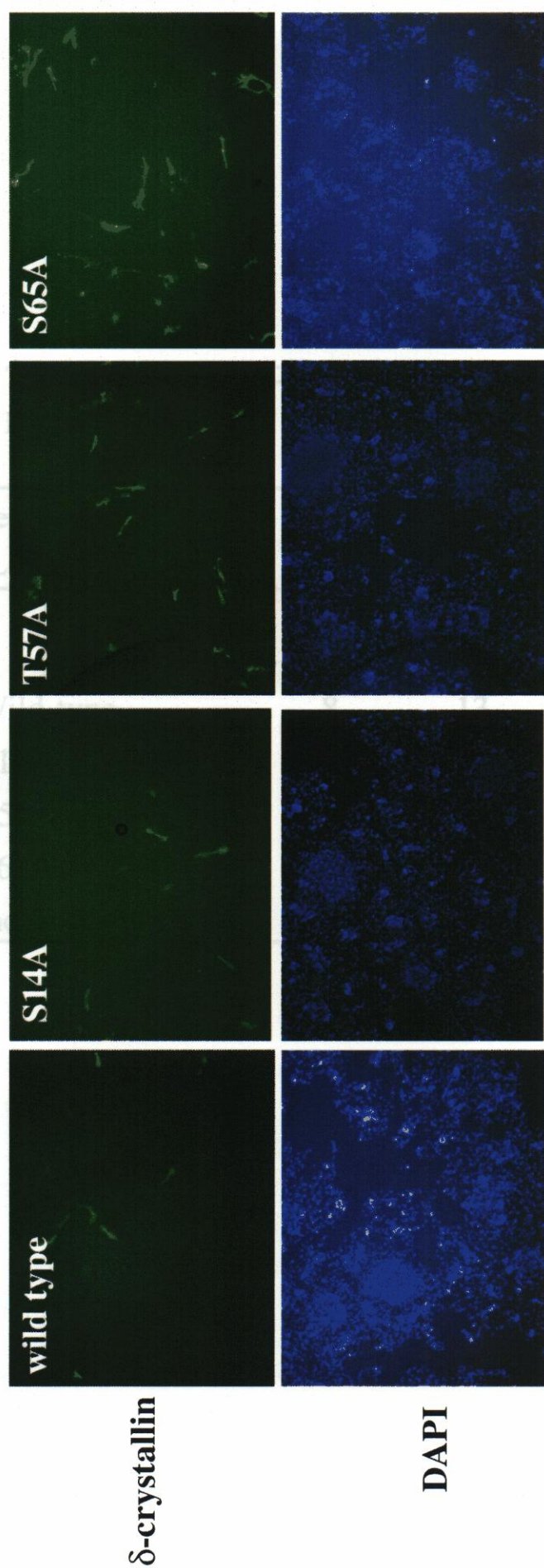


図 3-19 MAPK 標的リン酸化配列への変異の導入は、 $\delta$ -クリスタリンの誘導活性を促進する  
 初代培養神経性網膜細胞に野生型および変異型 L-Maf 発現プラスミド (pEFX L-Maf) を導入し (1 $\mu$ g/30mm 培養皿)、48 時間培養後、細胞を固定し抗  $\delta$ -クリスタリン抗体をもちいて免疫染色をおこなった。

**Table 1.** MAPK リン酸化配列への変異の導入は  
L-Maf のクリスタリン誘導能を促進する

| Overexpressed<br>L-Maf | No. of $\delta$ -crystallin-positive cells / 2.4 mm <sup>2</sup> |      |       |      |
|------------------------|------------------------------------------------------------------|------|-------|------|
|                        | Experiment                                                       | No.1 | No. 2 | No.3 |
| Wild-type              |                                                                  | 8    | 13    | 5    |
| S14A                   |                                                                  | 12   | 26    | 14   |
| T57A                   |                                                                  | 20   | 40    | 18   |
| S65A                   |                                                                  | 29   | 47    | 13   |
| mock                   |                                                                  | 0    | 0     | 0    |

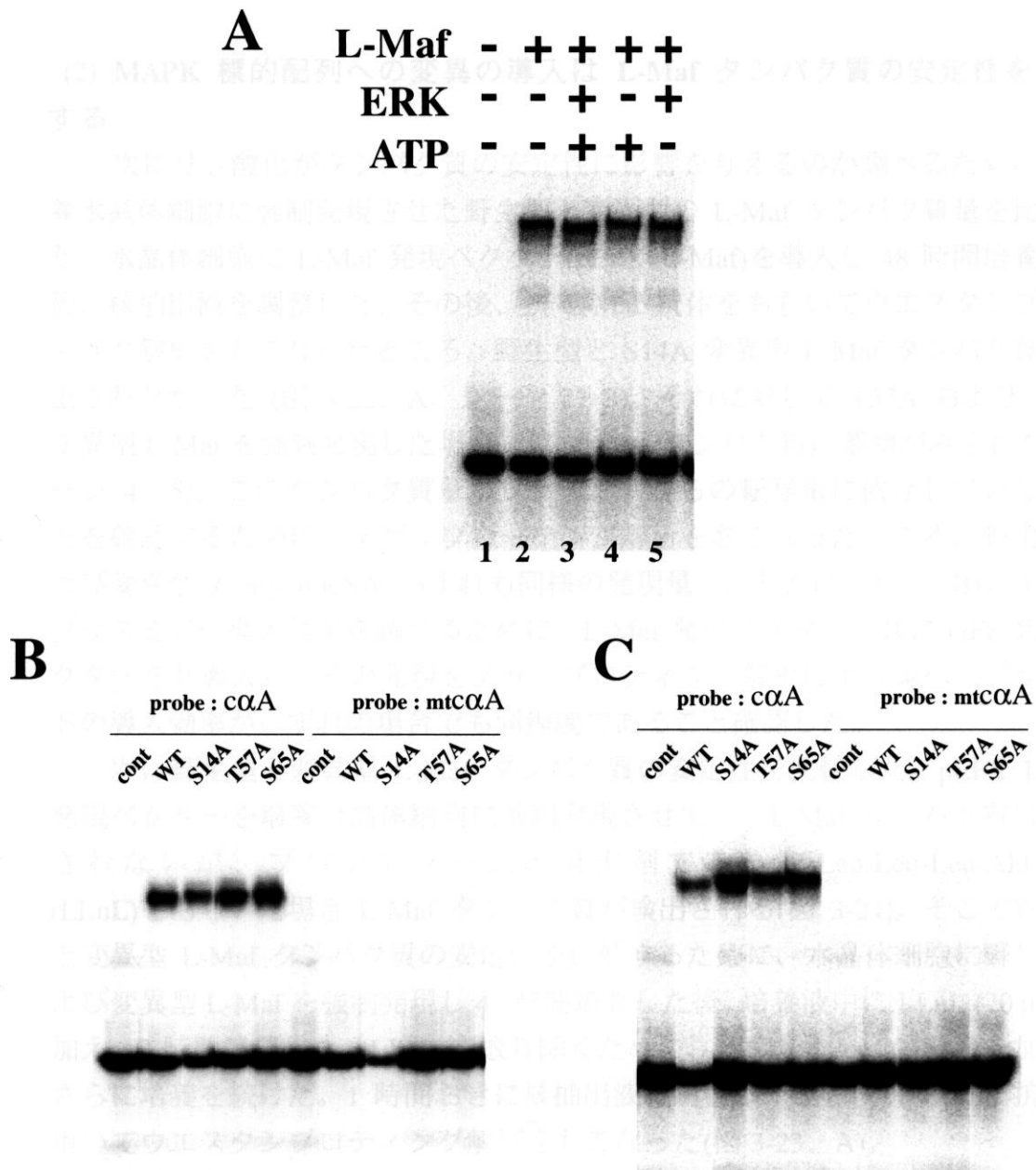


図 3-20 L-Maf の結合活性はリン酸化により影響をうけない

(A) 大腸菌から精製した L-Maf タンパク質を ERK をもちいてリン酸化した後、αA- クリスタリンエンハンサー (αCE2) に含まれる L-Maf の結合配列 (cαA) をプローブとしてゲル移動度シフトアッセイをおこなった。

(B) 網状赤血球のライセートをもちいて野生型および変異型 L-Maf タンパク質を調整した後、cαA をプローブとしてゲル移動度シフトアッセイをおこなった。(C) 網状赤血球のライセートをもちいて野生型および変異型 L-Maf タンパク質を調整した、精製 ERK をもちいて in vitro リン酸化反応をおこなった後、cαA をプローブとしてゲル移動度シフトアッセイをおこなった。

## (2) MAPK 標的配列への変異の導入は L-Maf タンパク質の安定性を促進する

次にリン酸化がタンパク質の安定性に影響を与えるのか調べるために、培養水晶体細胞に強制発現させた野生型と変異型の L-Maf タンパク質量を比較した。水晶体細胞に L-Maf 発現ベクター(pEFX L-Maf)を導入し 48 時間培養した後、核抽出液を調整した。その後、抗 L-Maf 抗体をもちいてウエスタンブロッティング解析をおこなったところ、野生型と S14A 変異型 L-Maf タンパク質は検出されなかった(図 3-22、A、レーン 2、3)。それに対して T57A および S65A 変異型 L-Maf を強制発現した場合では、L-Maf タンパク質の蓄積がみられた(レーン 4、5)。このタンパク質量がプラスミドからの転写量に依存していないことを確認するために、ノザンブロッティング解析をおこなったところ、野生型および変異型 *L-maf* mRNA いずれも同様の発現量を示した(図 3-22、B)。また、プラスミドの導入効率を調べるために、L-Maf 発現ベクターと共に GFP 発現ベクターを共導入し、その発現をノザンブロッティング解析により調べ、プラスミドの導入効率がいずれの場合でも同程度であること確認した。

次に野生型と変異型 L-Maf タンパク質の安定性を比較した。pEFX L-Maf 発現ベクターを培養水晶体細胞に強制発現させても、L-Maf タンパク質は検出されないが、プロテアソームの阻害剤である Z-Leu-Leu-Leu-Aldehyde (LLnL)をもちいた場合 L-Maf タンパク質が検出される(図 3-24)。そこで野生型と変異型 L-Maf タンパク質の安定性を比較するために、水晶体細胞に野生型および変異型 L-Maf を強制発現し 45 時間培養した後、培養液中に LLnL (20  $\mu$ g/ml) 加え、3 時間培養した。LLnL を取り除くために、細胞を洗い、培養液を加えてさらに培養を続けた。1 時間おきに核抽出液を調整し、その後抗 L-Maf 抗体を用いてウエスタンブロッティング解析をおこなった(図 3-23、A)。

阻害剤を取り除いて 2 時間後、野生型 L-Maf タンパク質は減少しているのに対して、変異型 L-Maf タンパク質は阻害剤を取り除いて 3 時間後においても検出される(図 3-23、B)。以上の結果から、変異型 L-Maf タンパク質は野生型と比べて安定であることがわかった。これらのことは L-Maf はリン酸化によりタンパク質の安定性が制御されることを示している。

## (3) L-Maf タンパク質はプロテアソームにより分解される

ある細胞が分化するとき、その細胞の増殖や分化の司る因子の発現が時間的、空間的に制御され必要がある。近年、細胞周期に関わる因子や組織の分化に関わる因子が選択的な分解の制御を受けることで、時間的、空間的な発現が

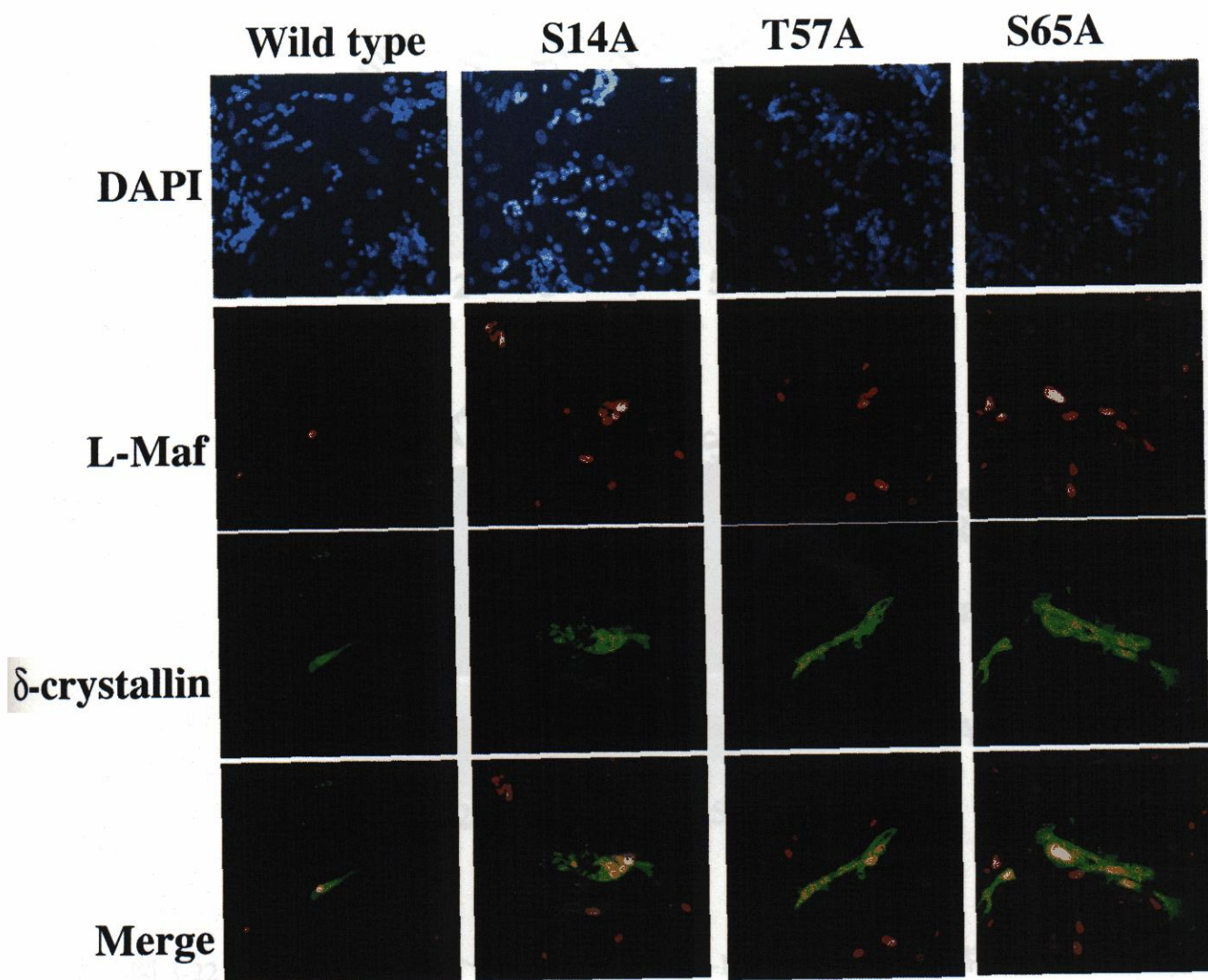


図 3-21 野生型および変異型 L-Maf の核局在

MAPK 標的リン酸化配列への変異の導入により L-Maf の核局在が影響を受けるか調べるために、野生型および変異型 L-Maf を培養神経性網膜細胞へ導入し、48 時間培養した後、細胞を固定して抗 L-Maf 抗体および抗  $\delta$ -クリスタリン抗体をもちいて二重免疫染色をおこなった。

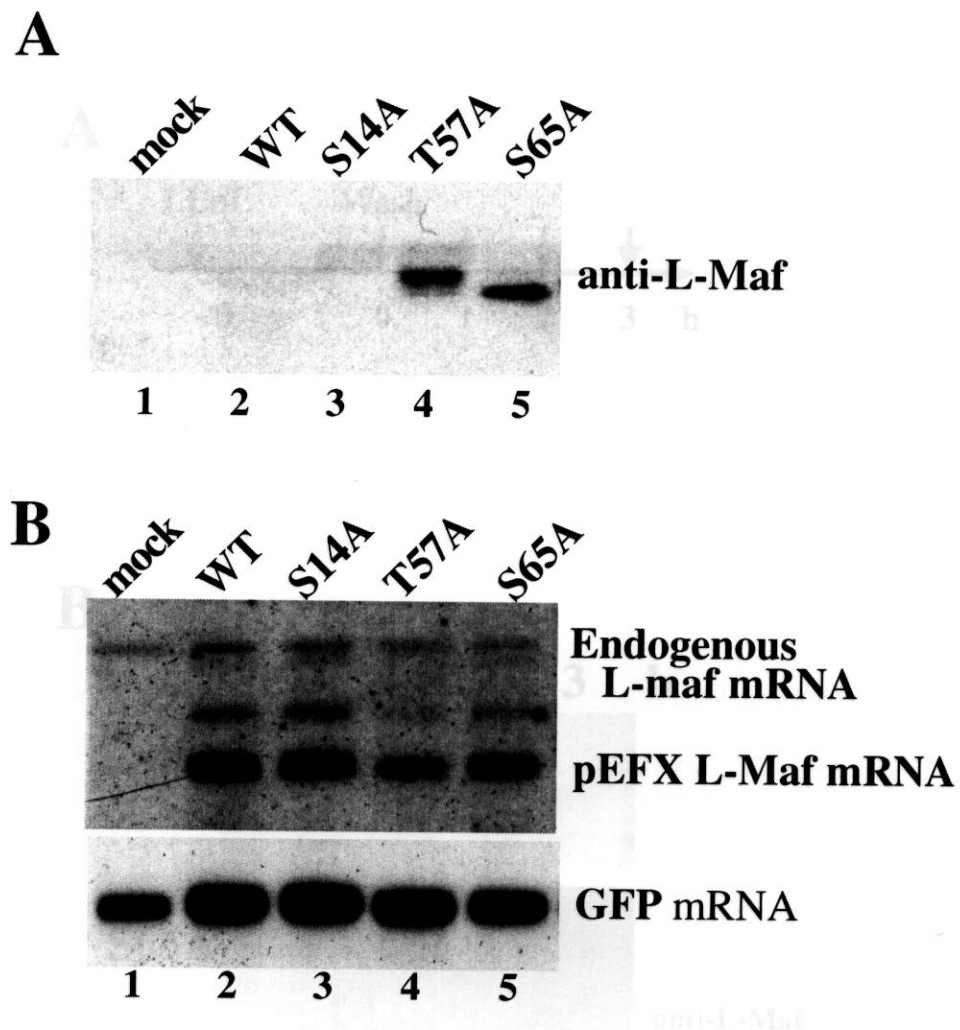


図 3-22 MAPK 標的配列への変異の導入は L-Maf タンパク質の蓄積を促進する

(A) 培養水晶体細胞に野生型および変異型 L-Maf(pEFX-LMaf) を導入し、48 時間培養し、抗 L-Maf 抗体をもちいてウエスタンブロッティング解析をおこなった。

(B) 培養水晶体細胞に野生型および変異型 L-Maf(pEFX-L-Maf) を導入し、48 時間培養した後、ノザンブロッティング解析をおこなった。トランスフェクション効率を調べるために pCAGGS -GFP を共導入し、同様にノザンブロッティング解析をおこなった。

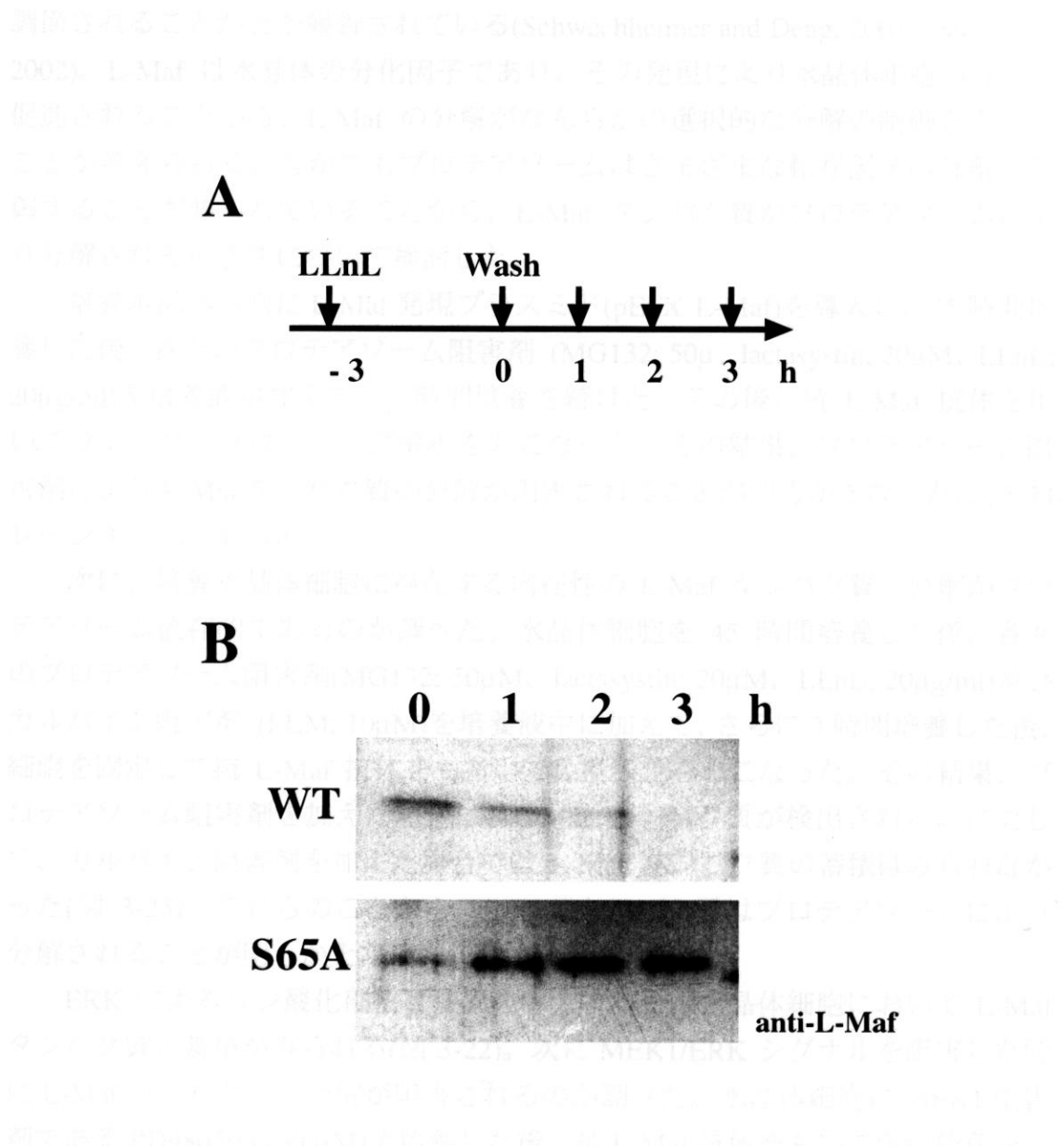


図 3-23 野生型 L-Maf タンパク質は変異型 L-Maf と比較して不安定である  
 (A) 実験の概略。培養水晶体細胞において L-Maf タンパク質が検出できないため、プロテアソーム阻害剤である LLnL をもちいてタンパク質の分解を阻害した。阻害剤を取り除くために細胞を培養液で洗浄した後、新しい培養液を加えてさらに培養を続けた。その後 1 時間おきに細胞を回収し、核タンパク質を調整した。(B) それぞれの核抽出液を、抗 L-Maf 抗体をもちいてウエスタンブロッティング解析をおこなった。

調節されることがとが報告されている(Schwechheimer and Deng, 2001) (Suh et al., 2002)。L-Maf は水晶体の分化因子であり、その発現により水晶体細胞の分化が促進されることから、L-Maf の分解がなんらかの選択的な分解の制御をうけることが考えられる。なかでもプロテアソームはさまざまな転写因子の分解を制御することが知られていることから、L-Maf タンパク質がプロテアソームにより分解される可能性について検討した。

培養水晶体細胞に L-Maf 発現プラスミド(pEFX L-Maf)を導入し、45 時間培養した後、各々のプロテアソーム阻害剤 (MG132; 50 $\mu$ M, lactasystin; 20 $\mu$ M, LLnL; 20 $\mu$ g/ml)を培養液に加えて、3 時間培養を続けた。その後、抗 L-Maf 抗体を用いてウエスタンブロッティング解析をおこなった。その結果、プロテアソーム阻害剤により L-Maf タンパク質の分解が阻害されることが明らかとなった(図 3-24、レーン 3、4、5、6)。

次に、培養水晶体細胞に存在する内在性の L-Maf タンパク質の分解がプロテアソーム依存的であるのか調べた。水晶体細胞を 45 時間培養した後、各々のプロテアソーム阻害剤(MG132; 50 $\mu$ M, lactasystin; 20 $\mu$ M, LLnL; 20 $\mu$ g/ml)及びカルパイン阻害剤 (LLM; 10 $\mu$ M)を培養液に加えて、さらに 3 時間培養した後、細胞を固定して抗 L-Maf 抗体をもちいて免疫染色をおこなった。その結果、プロテアソーム阻害剤を加えた場合は、L-Maf タンパク質が検出されるのに対して、カルパイン阻害剤を加えた場合では L-Maf タンパク質の蓄積はみられなかった(図 3-25)。これらのことから、L-Maf タンパク質はプロテアソームにより分解されることが明らかとなった。

ERK によるリン酸化部位に変異を導入すると、水晶体細胞において L-Maf タンパク質の蓄積がみられる(図 3-22)。次に MEK1/ERK シグナルを阻害した時に L-Maf タンパク質の分解が阻害されるのか調べた。水晶体細胞に MEK1 阻害剤である PD98059 (100  $\mu$ M)で培養した後、抗 L-Maf 抗体をもいて免疫染色をおこなった。その結果、阻害剤を加えない場合と比較して、PD98059 を加えた場合、L-Maf タンパク質の蓄積がみられた (図 3-26)。

これらのことから L-Maf タンパク質の安定性は ERK シグナルにより制御されており、その分解はプロテアソームを介しておこなわれていることが明らかとなった。

## 第 4 節 繊維細胞分化における L-Maf タンパク質の発現

### (1)培養水晶体細胞における L-Maf タンパク質の発現解析

L-Maf は FGF/ERK シグナルによりタンパク質の安定性のレベルで抑制さ

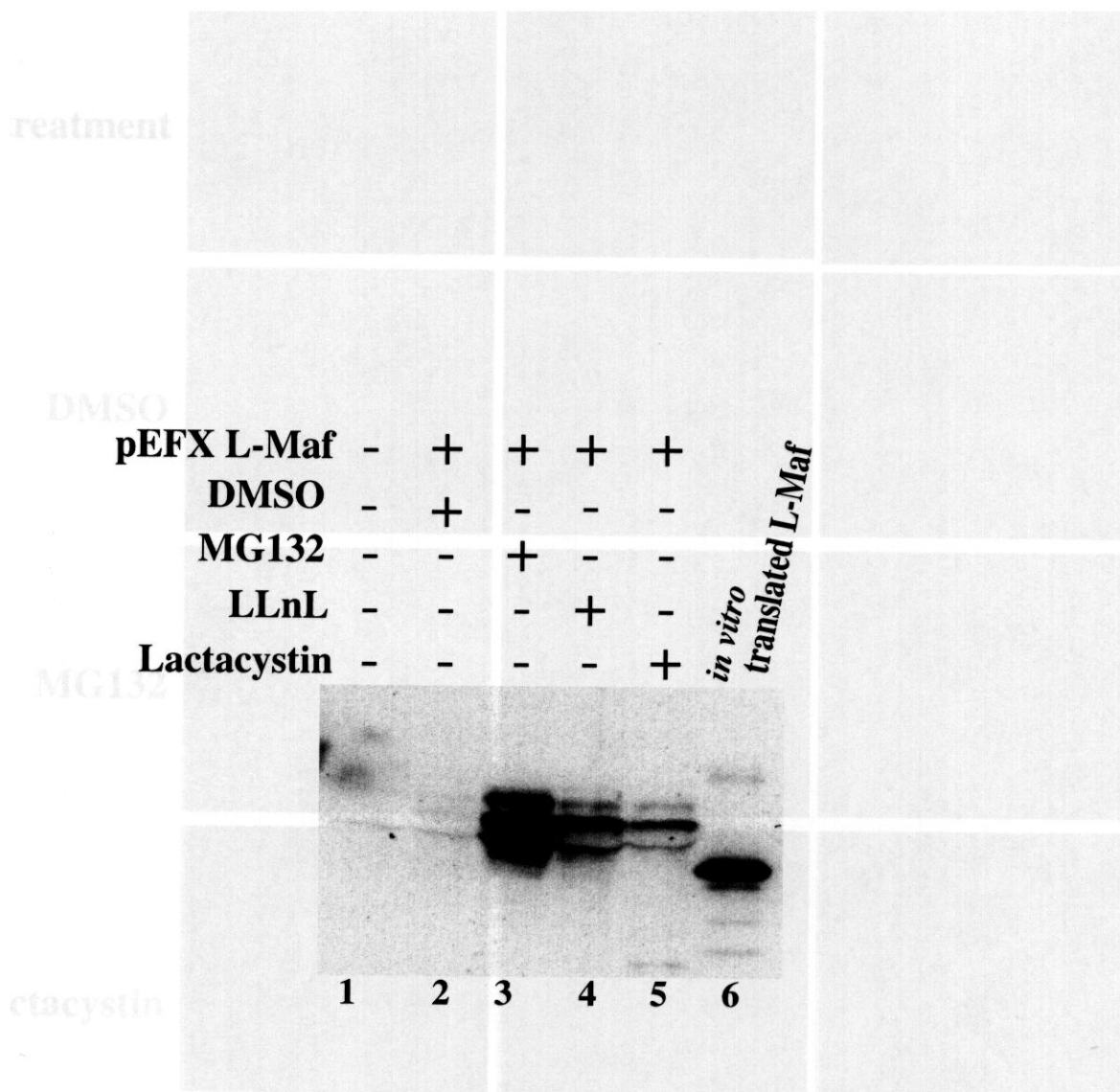


図 3-24 プロテアソーム阻害剤により L-Maf タンパク質の分解は阻害される  
 培養水晶体細胞に野生型 L-Maf (pEFX-L-Maf) を導入し、45 時間培養した後、プロテアソーム阻害剤 (MG132; 50μM, lactasystin; 20μM, LLnL; 20μg/ml) を培養液に加えてさらに 3 時間培養した。その後、核タンパク質を調整し、抗 L-Maf 抗体をもちいてウエスタンブロッティング解析をおこなった。

(図 3-24) プロテアソーム阻害剤により L-Maf タンパク質の分解は阻害される  
 培養水晶体細胞に阻害剤 (MG132; 50μM, lactasystin; 20μM, LLnL; 20μg/ml, LLM; 10μM) を加えて 3 時間培養した後、細胞を固定して抗 L-Maf 抗体をもちいて免疫染色をおこなった。Axio Cam (ZEISS) をもちいて L-Maf は 360nm, DAPI は 420nm で露光した。

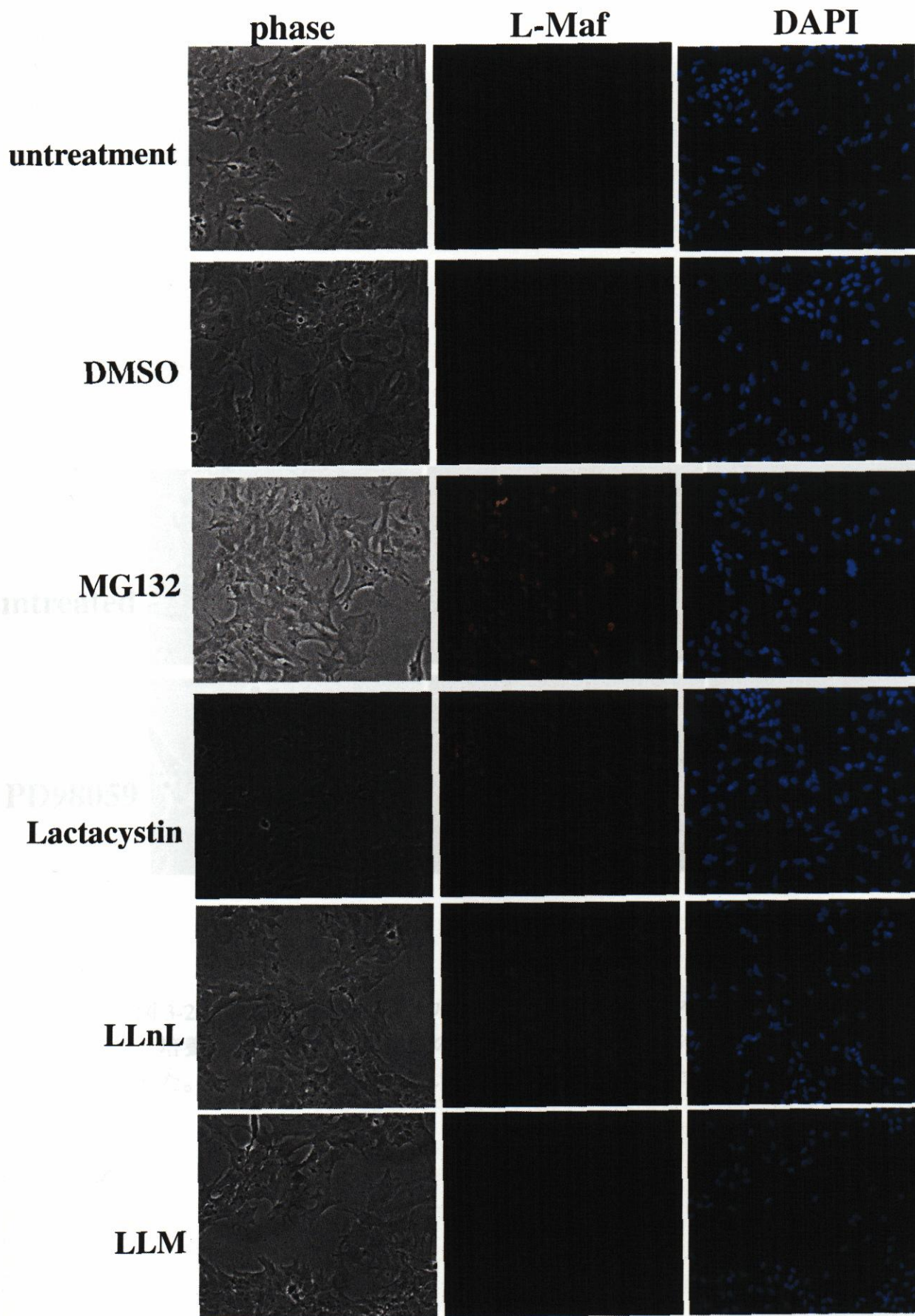


図 3-25 プロテアソーム阻害剤により L-Maf タンパク質の分解は阻害される  
 培養水晶体細胞に阻害剤 (MG132; 50 $\mu$ M, lactacystin; 20 $\mu$ M, LLnL; 20 $\mu$ g/ml, LLM; 10 $\mu$ M) を加えて 3 時間培養した後、細胞を固定して抗 L-Maf 抗体をもちいて免疫染色をおこなった。Axio Cam (ZEISS) をもちいて L-Maf は 2000msec、DAPI は 1200msec で露光した。

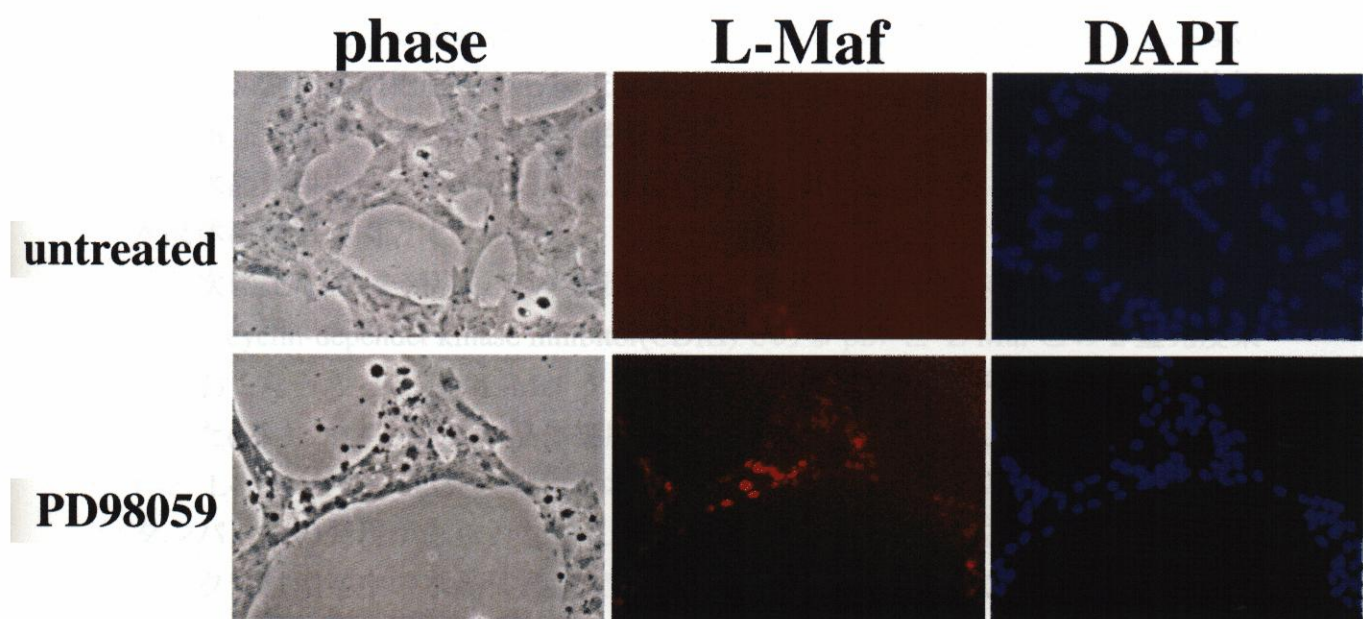


図 3-26 MEK1/ERK シグナルの阻害により L-Maf タンパク質が蓄積する  
 培養水晶体細胞に MEK1 の阻害剤である PD98059 を加えて、48 時間培養した。その後、細胞を固定し抗 L-Maf 抗体をもちいて免疫染色をおこなった。

れることが明らかとなった。では、L-Maf タンパク質の蓄積は水晶体細胞の分化のいつ、どのような場所で必要となるのだろうか。L-Maf タンパク質の蓄積と水晶体細胞の分化の関係を探るために、L-Maf タンパク質とリン酸化型 ERK の発現解析をおこなった。

水晶体細胞を培養すると、細胞どうしが密になったところから繊維細胞分化し始め水晶体様構造を形成する(Okada et al., 1971) (Menko et al., 1984)。この水晶体様構造の形成に伴い水晶体特異的タンパク質であるクリスタリンの発現が増大する。水晶体様構造は、構造体の中心では繊維状に分化した細胞と構造体の周辺部に存在する繊維状になっていない、つまり、まだ分化を終えていない細胞と、2 種類の細胞種から構成されていることが報告されている。水晶体細胞を 6 日間培養した後、免疫染色をおこなったところ、L-Maf タンパク質の発現は水晶体様構造の中心部みられた(図 3-27)。それに対してリン酸化型 ERK は水晶体様構造の周辺でみられた。

次に L-Maf を発現している細胞が増殖を停止した細胞であるのか調べるために、cyclin-dependent kinase inhibitor(CDKI)である p27 と L-Maf との 2 重免疫染色をおこなったところ、L-Maf タンパク質の発現と p27 の発現は同じ細胞でみられた(図 3-28)。さらに水晶体細胞を BrdU で 24 時間処理した後、抗 BrdU 抗体と L-Maf との 2 重免疫染色をおこなったところ、BrdU 陽性細胞では L-Maf タンパク質の発現がみられないことがわかった。これらのことから、L-Maf タンパク質は増殖中の水晶体細胞では、その発現が抑制されており、分化する細胞でそのタンパク質が蓄積し水晶体繊維細胞へと最終分化するものと考えられる。

## (2) ニワトリ水晶体における L-Maf タンパク質の発現

培養水晶体細胞でみられた L-Maf の発現は、個体内の水晶体細胞においても同様にみられるのであろうか。L-Maf の個体内における発現様式を解析するために、ニワトリ胚の水晶体の凍結切片をもちいて、抗 L-Maf 抗体で免疫染色をおこなった。その結果、*L-maf* mRNA の発現は上皮細胞と繊維細胞のいずれにおいても、発現がみられるのに対して (図 3-29、A)。L-Maf タンパク質は赤道面上から繊維細胞にかけて発現がみられた(図 3-29、B)。次に L-Maf タンパク質の発現と p27、増殖能をもつ細胞のマーカーとして PCNA を用いてそれぞれの発現を比較した。p27 は L-Maf と同様に細胞増殖が活発な赤道面上から後方の、水晶体繊維細胞で強い発現がみられた(図 3-30、A)。それに対して PCNA は赤道面上から前方の水晶体上皮細胞でその発現がみられることが明らかとなった (図 3-30、B)。これらのことから個体内の水晶体上皮細胞から繊維細胞へ

の分化にも培養水晶体細胞でみられた安定化した L-Maf が重要な役割を果たしていることが考えられる。

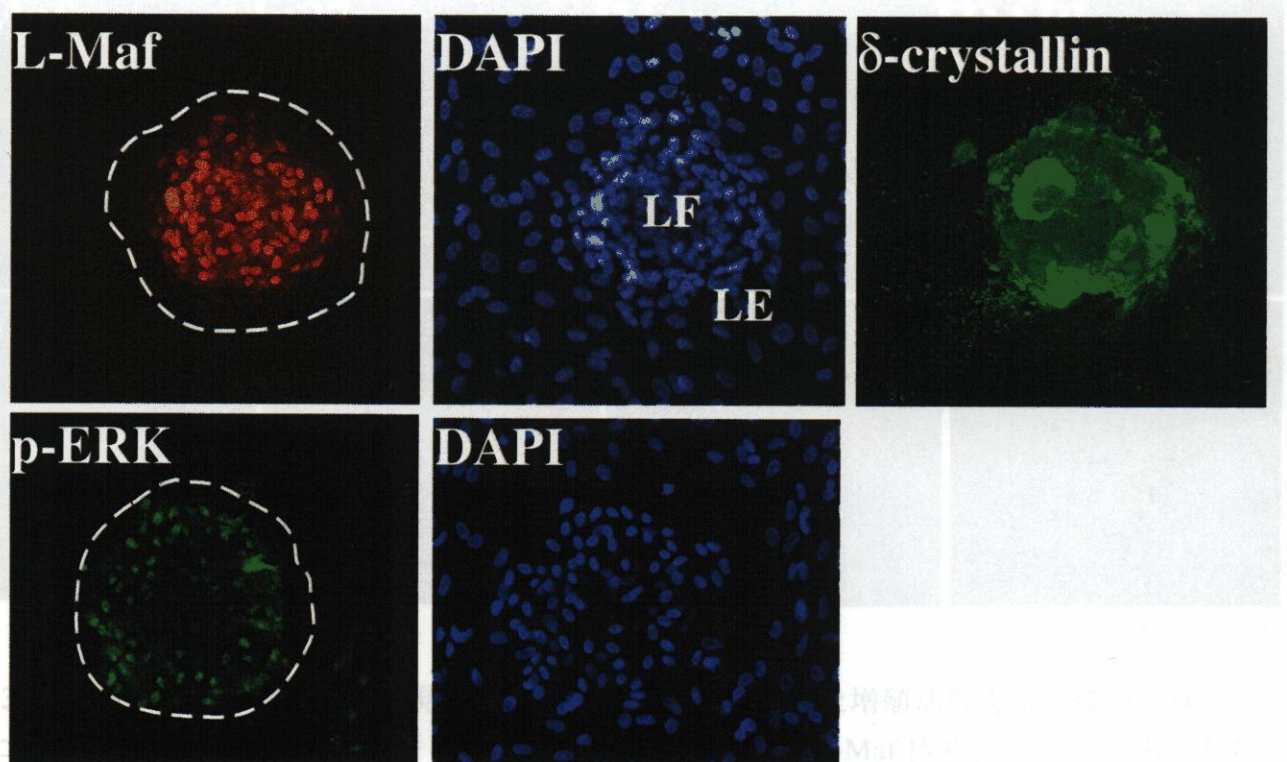


図 3-27 L-Maf タンパク質およびリン酸化 ERK の発現解析

培養水晶体細胞を 6 日間培養した後、細胞を固定し、抗 L-Maf 抗体、抗 δ-クリスタリン抗体および抗リン酸化 ERK 抗体をもちいて、免疫染色をおこなった。その後、オリンパス AX70 共焦点レーザー顕微鏡をもちいて解析をおこなった。LE; 水晶体上皮細胞 LF; 水晶体繊維細胞

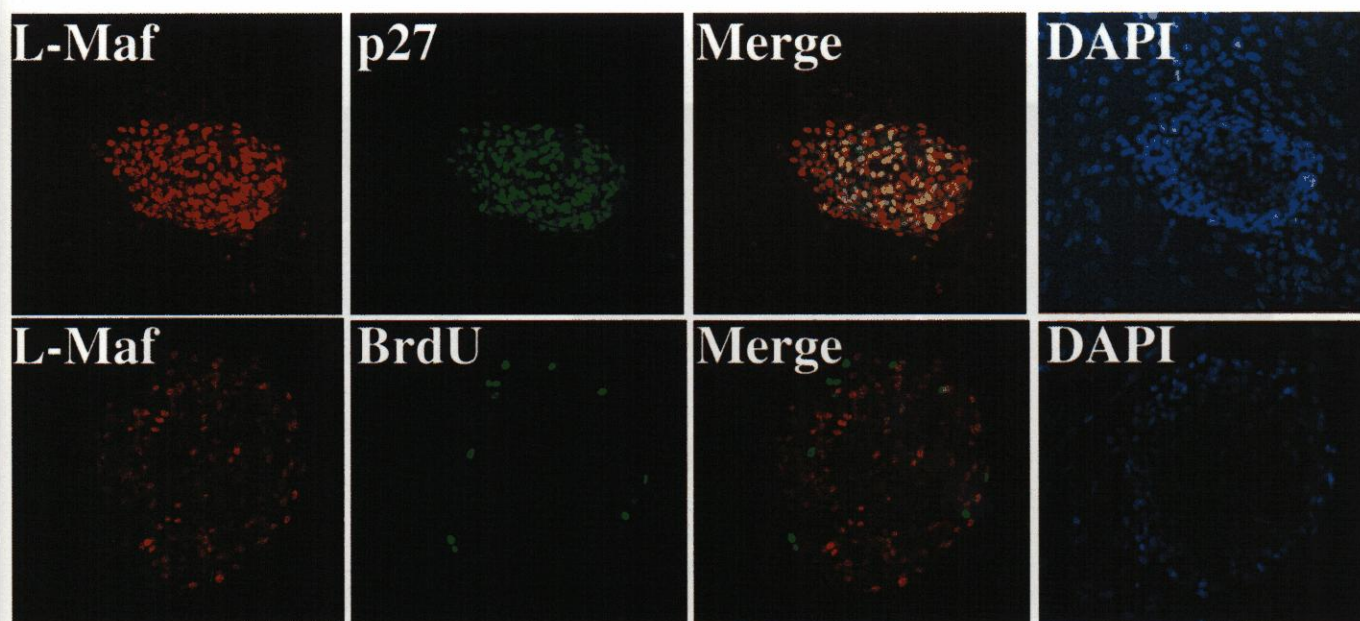


図 3-28 CDK inhibitor/p27 の発現解析および BrdU をもちいた増殖活性をもつ細胞の検出  
 (上段) 水晶体細胞を 6 日間培養した後、細胞を固定し、抗 L-Maf 抗体、抗 p27 抗体をもちいて免疫染色をおこなった。その後、オリンパス AX70 共焦点レーザー顕微鏡をもちいて解析をおこなった。(下段) 水晶体細胞を培養し、水晶体様構造が形成され始めていることを確認したのち、100 $\mu$ M の BrdU を培養液中加入して 24 時間培養した。その後、細胞を固定して抗 BrdU 抗体をもちいて免疫染色をおこなった。

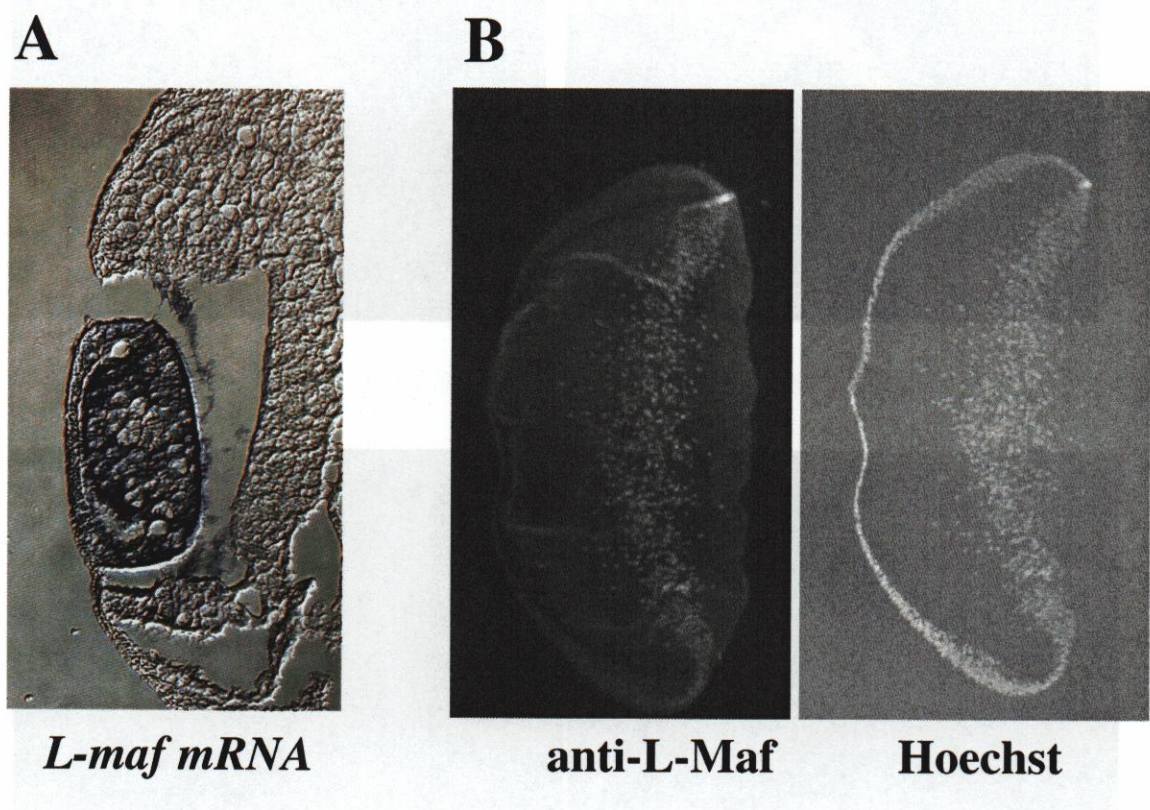


図 3-29 L-Maf タンパク質および *L-maf* mRNA の発現解析  
 (A) ニワトリ胚の水晶体の *L-maf* mRNA の発現 (3 日目胚)  
 (B) ニワトリ胚の水晶体の L-Maf タンパク質の発現。(6 日目胚)Hoechst は核を示す。

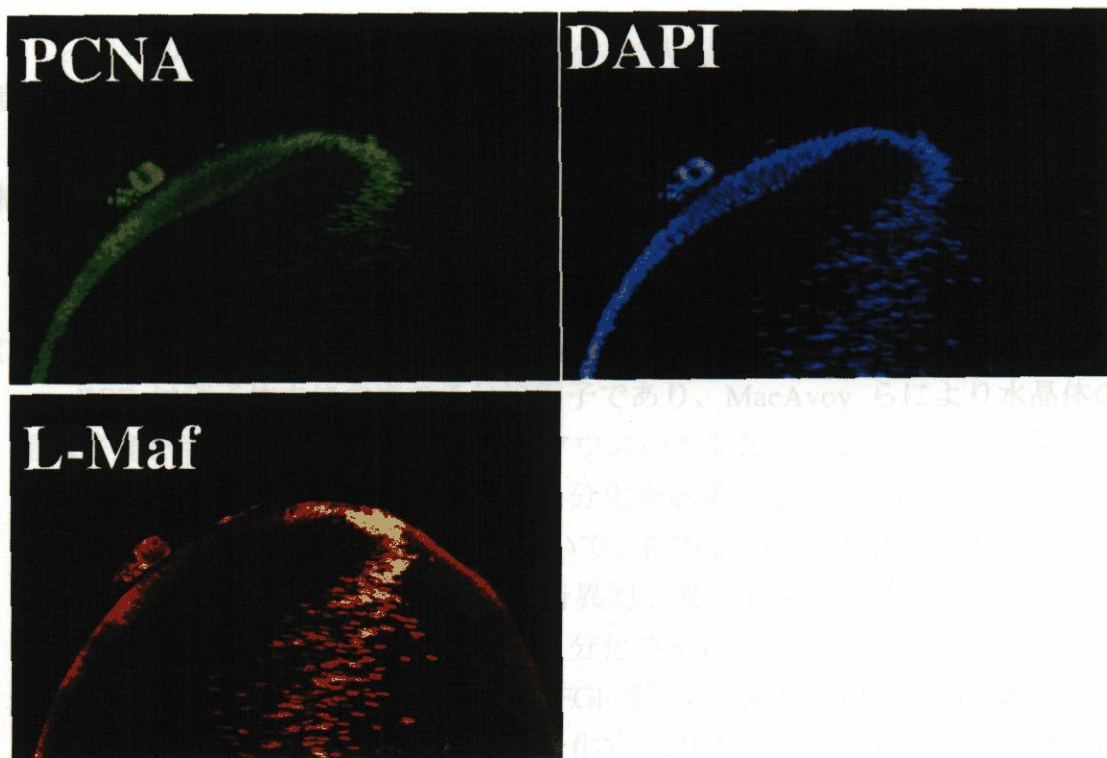
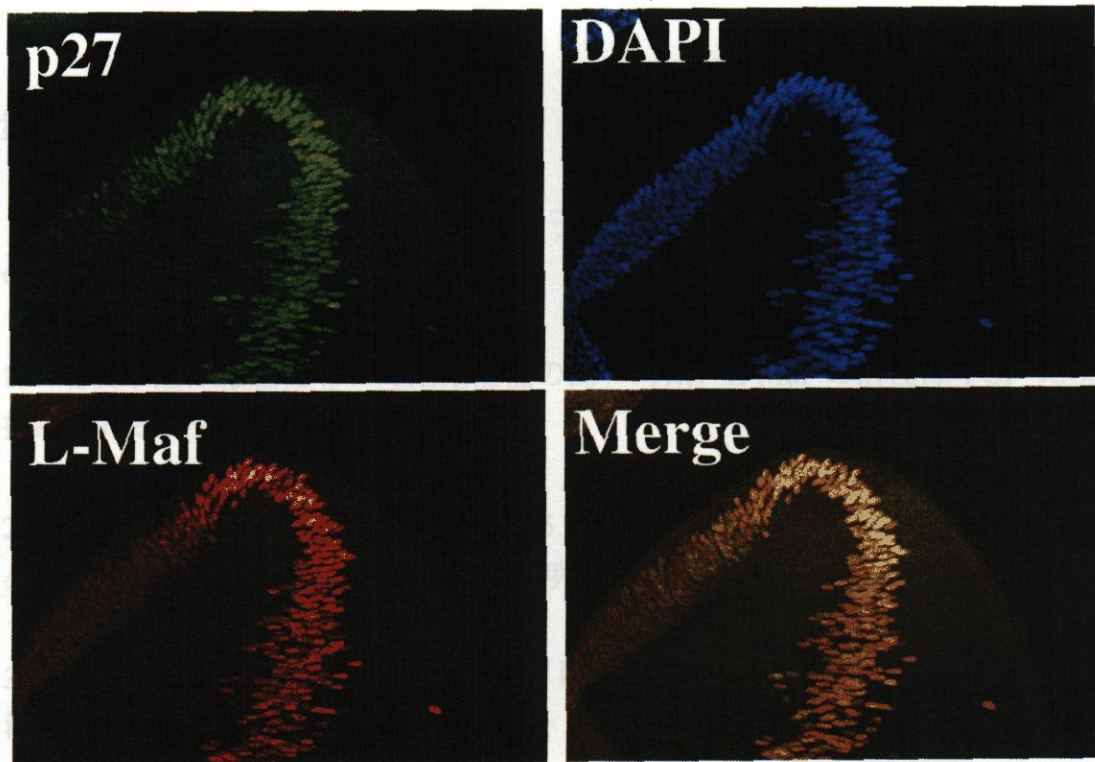


図 3-30 p27 および PCNA の発現解析

6 日目ニワトリ胚の水晶体を抗 27 抗体、抗 PCNA 抗体をもちいて免疫組織染色をおこなった。

## 第4章 考察

本研究において水晶体分化制御因子 L-Maf の分子メカニズムについて以下の知見を得た。

1. 培養水晶体細胞において増殖活性の高い時期、L-Maf の活性は FGF により抑制されることを明らかにした。
2. L-Maf は ERK により Thr57 と Ser65 がリン酸化され、そのリン酸化は L-Maf タンパク質の安定性を制御することを明らかにした。
3. リン酸化を受けない変異型 L-Maf は野生型と比較してクリスタリンの誘導活性が高いことを明らかとした。
4. L-Maf タンパク質は水晶体繊維細胞に発現することを明らかとした。

以上の知見から、FGF シグナルによる L-Maf の機能の調節が水晶体分化に重要な役割を果たすものと結論した。

本研究から明らかとなった FGF による L-Maf の機能調節と水晶体分化機構に関して考察する。

### (1) FGF による水晶体細胞の増殖と分化制御

FGF は硝子体中に含まれる分泌因子であり、MacAvoy らにより水晶体の組織培養を用いた場合でも、FGF をマウスの水晶体に強制発現させた場合いづれにおいても、水晶体細胞の増殖と分化を制御することが明らかとされていた(Schulz et al., 1993)。本研究において、FGF は培養水晶体細胞の増殖と分化を制御するが、FGF による水晶体特異的な遺伝子群の発現制御には細胞の増殖期とその後みられる繊維細胞へと分化する期間では異なることが示された。現在までに様々な細胞を用いて、FGF や epidermal growth factor (EGF)などの細胞増殖因子が、細胞の増殖期と分化する時期に、それぞれ異なる機能を発揮することが示されている。例えば、筋分化のモデル系として用いられている C2C12 細胞(mouse C2C12 myoblast cells)では、細胞の増殖は FGF-2 により促進されるのに対して、cell-cell contact により始まる筋分化は FGF-2 により阻害される(Yoshida et al., 1996)。また神経細胞の分化モデル系として用いられ

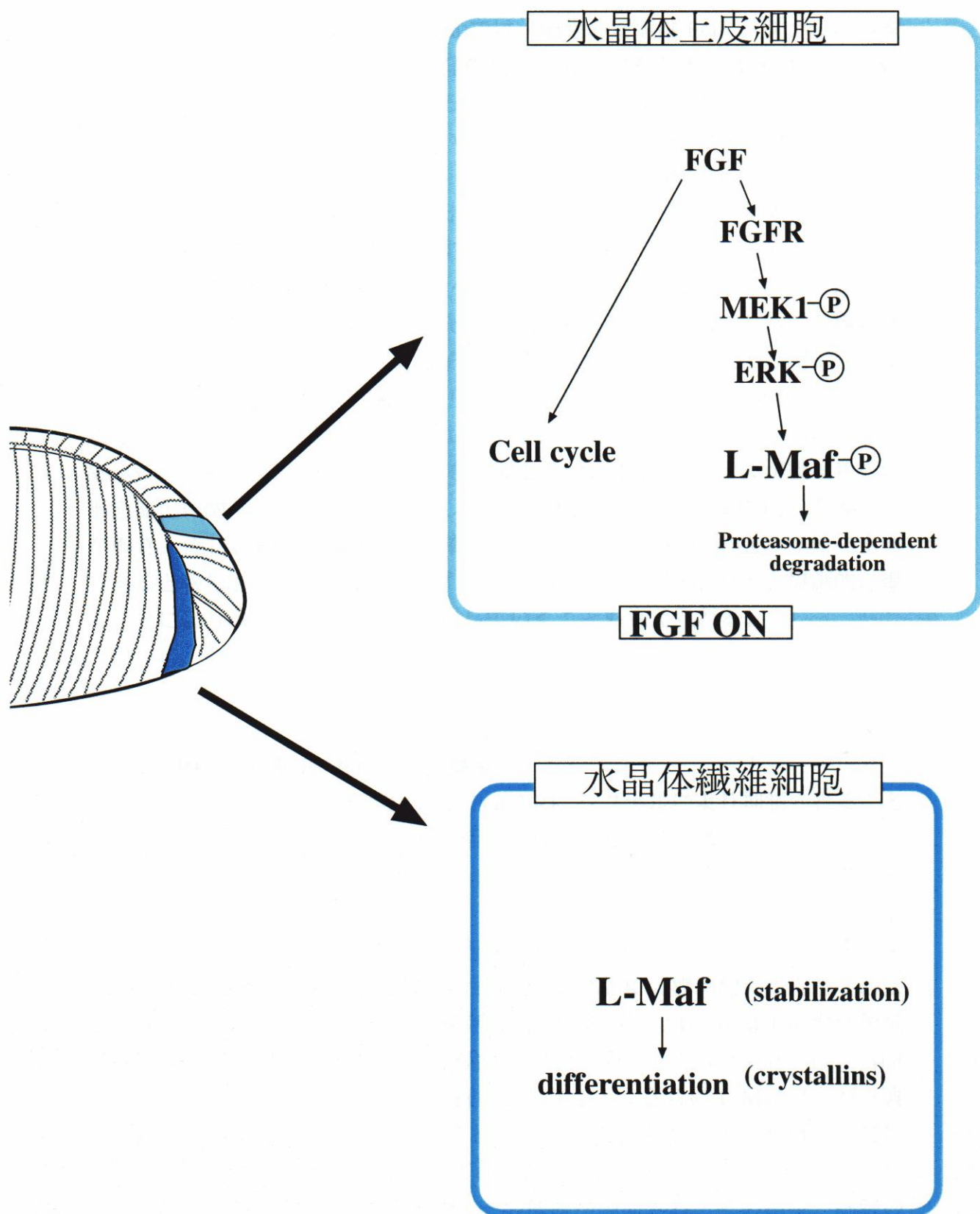


図 4-1 FGF シグナルによる L-Maf の調節機構

ている PC12 細胞(pheochromocytoma)では、細胞の増殖は EGF シグナルに応答をして促進されるのに対して、神経細胞様に分化するときには FGF と nerve growth factor(NGF)刺激で促進されることが知られている (Kao et al., 2001)。このようなことから水晶体細胞において FGF は細胞の増殖のみに働き、その後の分化には別の因子が関わることを、もしくは細胞の増殖は FGF により促進され、その後 FGF とその他の増殖因子がそれぞれ異なる機能を発揮しながら、強制的に繊維細胞への分化を制御することが考えられる。現在までのところ、FGF は増殖だけでなく、繊維細胞への分化そのものにも働いていると考えられる結果が報告されている。McAvoy らは繊維細胞への分化において、繊維状への形態変化とクリスタリン遺伝子の発現はどちらも FGF により制御されるものの、その下流で働く ERK はクリスタリン遺伝子の発現には必要であるが、繊維状の形態へと分化するのには必要ないことを報告している(Lovicu and McAvoy, 2001)。このことは ERK を必要としない FGF シグナルが繊維状への形態変化に関与していることを示している。FGF の下流で ERK 以外の MAPK が働き、直接、細胞の繊維化を制御していることや、繊維細胞の移動に重要であると報告されている TGF $\beta$ シグナル (Maruno et al., 2002)などと協調的に働くことにより繊維状へと形態が変化していくことも考えられる。

## (2) FGF/ERK による L-Maf の活性調節

本研究において L-Maf の活性が FGF/ERK シグナルにより抑制されることを見出した。では ERK が L-Maf の活性を抑制する分子機構とはいかなるものだろうか。L-maf mRNA の発現は、FGF-2 の存在下で培養した場合、ほとんど変化はみられない(図 3-13)。L-Maf の活性が抑制される分子実体を解き明かす糸口として、次に Maf のアミノ酸配列上に MAPK の標的となる配列を検索した。L-Maf の酸性アミノ酸領域には 3 箇所の MAPK の標的配列が存在し、これらの配列は Maf ファミリー間で保存されている(図 3-14)。L-Maf の酸性領域と酵母の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインを融合した L-Maf(GAL4-L-Maf AD)の活性が、活性型 MEK1 により抑制されること、さらに L-Maf タンパク質が ERK により直接リン酸化されることから、MEK1/ERK により L-Maf の酸性領域がリン酸化されその活性が抑制されることが示された。

転写因子がリン酸化を受けることその機能が調節され、その結果、細胞の分化が制御されることが知られている。FGF は C2C12 の増殖を促進し分化を阻害するが、MyoD を含む Myogenic Helix-Loop-Helix 転写因子は FGF の刺激を

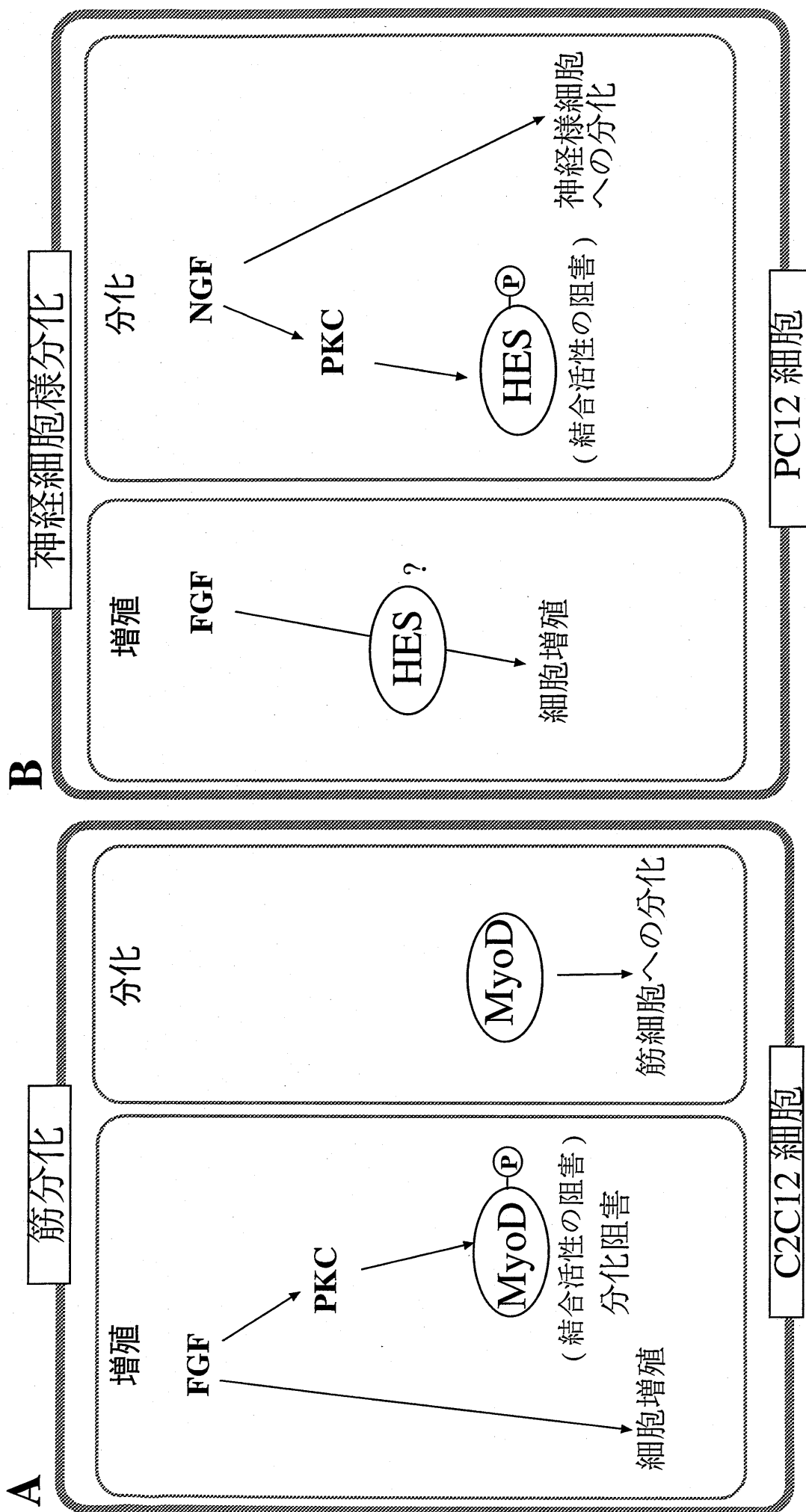


図 4-2 転写因子のリン酸化調により制御される細胞の増殖と分化

(A)C2C12 細胞では FGF により、その増殖が促進される。このとき FGF は筋分化を正に制御する転写因子 (MyoD など) のリン酸化を促進し、標的配列への結合を阻害する。(B)PC12 細胞において NGF は神経様細胞への分化を正に制御する。このとき NGF は神経様細胞への分化負に制御する転写因子 HES のリン酸化を促進し、標的配列への結合を阻害する。

受けて活性化した Protein kinase C によって DNA 結合ドメインがリン酸化され、その結合活性が減少し、その結果、筋分化が阻害されることが報告されている(Li et al., 1992) (図 4-2、A)。また NGF は PC12 の分化促進因子であるが、この NGF は protein kinase C を介して分化抑制因子である HES-1 の DNA 結合ドメインをリン酸化することにより HES-1 の機能を抑制し、細胞の分化を押し進めることが明らかとなっている(Strom et al., 1997) (図 4-2、B)。L-Maf は水晶体分化を正に押し進める転写因子であるため、細胞が増殖している間は FGF/ERK シグナルにより抑制されているものと考えられる。しかしながら ERK による L-Maf のリン酸化は DNA 結合領域ではなく酸性領域(転写活性化ドメイン)で起こること、さらに ERK による L-Maf のリン酸化はその DNA 結合活性に影響を与えないことを示している(図 3-20)。近年、転写因子の転写活性化ドメインが、転写因子の分解の引き金となることが注目されている。転写因子 Microphthalmia (MITF) は c-kit/MPAK によりリン酸化を受けその転写活性化能が増大するが、さらにそのリン酸化は MITF タンパク質の分解に導く(Hemesath et al., 1998) (Wu et al., 2000)。また転写因子 c-Jun は転写活性化領域がリン酸化を受けることでその転写活性化能が増大する(Karin, 1995)。c-Jun の場合このリン酸化によりユビキチン化が阻害され、c-Jun タンパク質の分解を免れることが知られている(Treier et al., 1994) (Musti et al., 1997)。L-Maf の場合、ERK による転写活性化ドメイン内の Thr57 と Ser65 がリン酸化され、このリン酸化が L-Maf タンパク質の安定性を制御していることが明らかとなった。

本実験で明らかとした Ser65 を含むアミノ酸 1-68 の領域を欠失した L-Maf ( $\Delta$ 1-67L-Maf)は、安定であることが示されている(大雲剛 修士論文)。さらに  $\Delta$ 1-67L-Maf は野生型と比較して高い転写活性化能をもつことから、L-Maf 転写活性化能は酸性領域 a.a.1-152 のうち、a.a.68 から 152 で十分であり酸性領域の 1-67 までは L-Maf の安定を制御する領域と考えられる。この a.a.1-67 の領域のアミノ酸配列を調べると、タンパク質の分解ドメイン(PEST ドメイン)で特徴的にみられるといわれている、(1)親水性アミノ酸が 12 個以上続き、(2)そのなかにプロリンを含み、(3) 正の電荷を持つアミノ酸を持つものがない、PEST ドメイン様の配列が存在している(図 4-3)。このことから a.a.1-67 は L-Maf の分解制御領域と考えられる。今後、L-Maf のドメインマップが詳細に解析されることにより分解制御に必要な十分である領域が明らかにされ、さらにその領域を介した、分解を制御する結合タンパク質などが明らかになると考えている。

# PEST ドメイン様配列

**L-Maf**  
 MASELAM-TAELLPTSP<sup>1</sup>LAIEYVND<sup>1</sup>DFDLMKFEVKKEPAE-AERL---CHRL-PAGSLSS<sup>1</sup>TPLSTP<sup>1</sup>CSSV<sup>1</sup>PSSP<sup>1</sup>SFCAPS<sup>1</sup>PG(74)

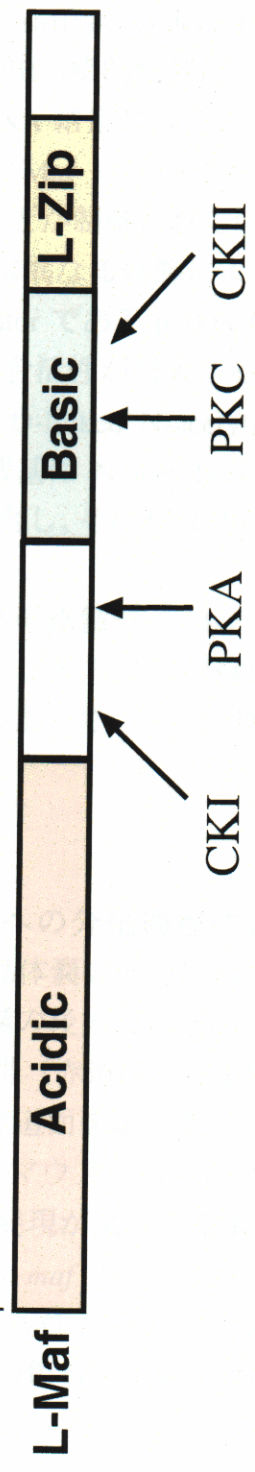


図 4-3 L-Maf アミノ酸配列中にみられるリン酸化配列  
 CKI: Casein Kinase I  
 PKA: cAMP-dependent Protein kinase I  
 PKC: Protein kinase C  
 CKII: Casein kinase II

### (3) L-Maf の活性を調節する転写後修飾

NIH3T3 細胞に Ser-14/Thr-57/Ser-65 を Ala に置換した L-Maf を強制発現し、*in vitro* で翻訳した L-Maf の分子量を比較すると、Ser-14/Thr-57/Ser-65 を Ala に置換した L-Maf の方が大きい分子量を示すことから(データは示さず)、Ser-14/Thr-57/Ser-65 以外でも何らかの修飾を受け、L-Maf の機能が調節されていることが考えられる。L-Maf のアミノ酸配列中には MAPK 以外のリン酸化酵素の標的配列が存在しており、例えばヒスチジン領域には Casein kinase I(CK1)標的配列が、塩基性アミノ酸領域は cAMP-dependent Protein kinase(PKA)、Protein kinase C(PKC)と Casein kinase II(CKII)の標的配列が存在している(図 4-3)。MyoD や Hes は Protein kinase C により DNA 結合ドメインがリン酸化され、その DNA 結合活性が調節されることから、L-Maf においても塩基性アミノ酸領域でのリン酸化修飾により DNA 結合活性などが制御されていることが考えられる。

転写因子の活性はリン酸化とは異なる修飾によっても調節されることも報告されている。GATA-1 は co-activator である p300/CBP により DNA 結合ドメイン内でアセチル化を受け、DNA 結合活性が増大することが知られている(Boyes et al., 1998)。また転写因子 Sp1 は O-linked N-acetylglucosamine(O-GlcNAc)により転写活性化ドメインの Ser/Thr 残基に N-acetylglucosamine を付加されることにより、転写抑制因子 mSin3A と結合し、その転写活性化能が抑制される(Yang et al., 2001)(Yang et al., 2002)。

今後、リン酸化やリン酸化以外の修飾が L-Maf の機能をどのように調節しているのか明らかになることにより、それぞれの修飾に関わる分子群が、細胞の増殖や分化にどのような役割を果たしているのか明らかになると考えられる。

### (4) 水晶体上皮細胞から繊維細胞への分化過程における L-Maf の役割

くぶりきれた水晶体では、水晶体囊の前方には水晶体上皮とよばれる一層の分裂能をもった細胞が、水晶体囊の後方には水晶体繊維細胞とよばれる脱核した細胞がみられる(図 1-2)。増殖帯(赤道面)で細胞分裂し増えた細胞は水晶体囊に沿って後方に追いやられ、赤道面を超えたあたりで、繊維細胞へと分化しはじめる。*c-maf* のノックアウトマウスでは水晶体繊維細胞の形成が不完全となり、また種々のクリスタリンの発現が減少する(Kim et al., 1999) (Kawauchi et al., 1999) (Ring et al., 2000)。さらに *c-maf* ノックアウトマウスでは、本来、赤道面より後方側に繊維細胞で発現がみられ p27 と p57 の発現がみられなくなり、本来細胞の増殖が停止しているこの領域での細胞増殖がみられるようになる

(Yoshida et al., 2001)。これらのことから個体内において、*maf* 遺伝子は繊維細胞への分化に必要であることがわかる。L-Maf タンパク質の安定性を制御する機構が個体内での水晶体繊維細胞の分化において必要なのであろうか。本研究から培養水晶体においては L-Maf タンパク質は繊維細胞へと分化した水晶体様構造中でみられ、また個体内においては、増殖帯とよばれるところ（赤道面）から赤道面を超えたあたり、繊維細胞へと分化しはじめる領域で L-Maf タンパク質発現がみられる。それに対して *L-maf* mRNA の発現は上皮細胞と繊維細胞のいずれにおいてもみられることから、L-Maf タンパク質の安定性の機構が赤道面上から繊維細胞へと分化する領域で機能することにより、L-Maf タンパク質の蓄積が核内でおこり、水晶体特異的な遺伝子群の転写が促進されることが考えられる。今後、ドミナントネガティブ型の FGFR や MEK1 をエレクトロポレーション法などにより、水晶体上皮細胞に強制発現させ、L-Maf タンパク質の蓄積やクリスタリンの発現を調べることにより、実際の水晶体細胞分化における L-Maf タンパク質の蓄積の役割が明らかになるものと考えている。

#### (5) 繊維細胞分化において FGF シグナルを阻害するメカニズム

L-Maf タンパク質が繊維細胞への分化に伴い、安定化するためには FGF シグナルを阻害する機構が必要となる。ではその分子メカニズムはどのようなものであろうか。FGF-2 は水晶体の上皮細胞、繊維細胞のいずれの細胞でも発現することが知られている(橘 篤導 修士論文)。このことから FGF のレセプターより下流において FGF シグナルを阻害する分子機構が働くことが考えられる。一つは FGF レセプターの発現様式の違いによる FGF シグナルの調節である。FGFR の発現様式が McAvoy らにより調べられた結果、水晶体上皮細胞では FGFR2 が強く発現し、増殖帯では FGFR1、2、3 が発現している。さらに分化した細胞が前後に進展しながら、周りから取り囲むようにして伸びてくる領域では FGFR3 の発現が強くみられ、FGFR2 と FGFR1 の発現が弱くなる(図 4-4)。このことから彼らは、FGFR の下流で異なる分子メカニズムが働くことにより、FGF が上皮細胞の増殖と繊維細胞の分化を制御していると考えている(de Jongh et al., 1997)。Overbeek らはカイネースドメインを欠失したドミナントネガティブ型の FGFR1 と 3 を水晶体で強制発現させた実験から、繊維細胞の分化は FGFR1 のドミナントネガティブ型では阻害されず、FGFR3 のドミナントネガティブ型によって阻害されること、さらに FGFR3 のドミナントネガティブ型を発現させた場合、活性型 ERK が検出されないことを示し、繊維細胞の分化は FGFR3 が関与することを明らかとした(Govindarajan and Overbeek, 2001)。

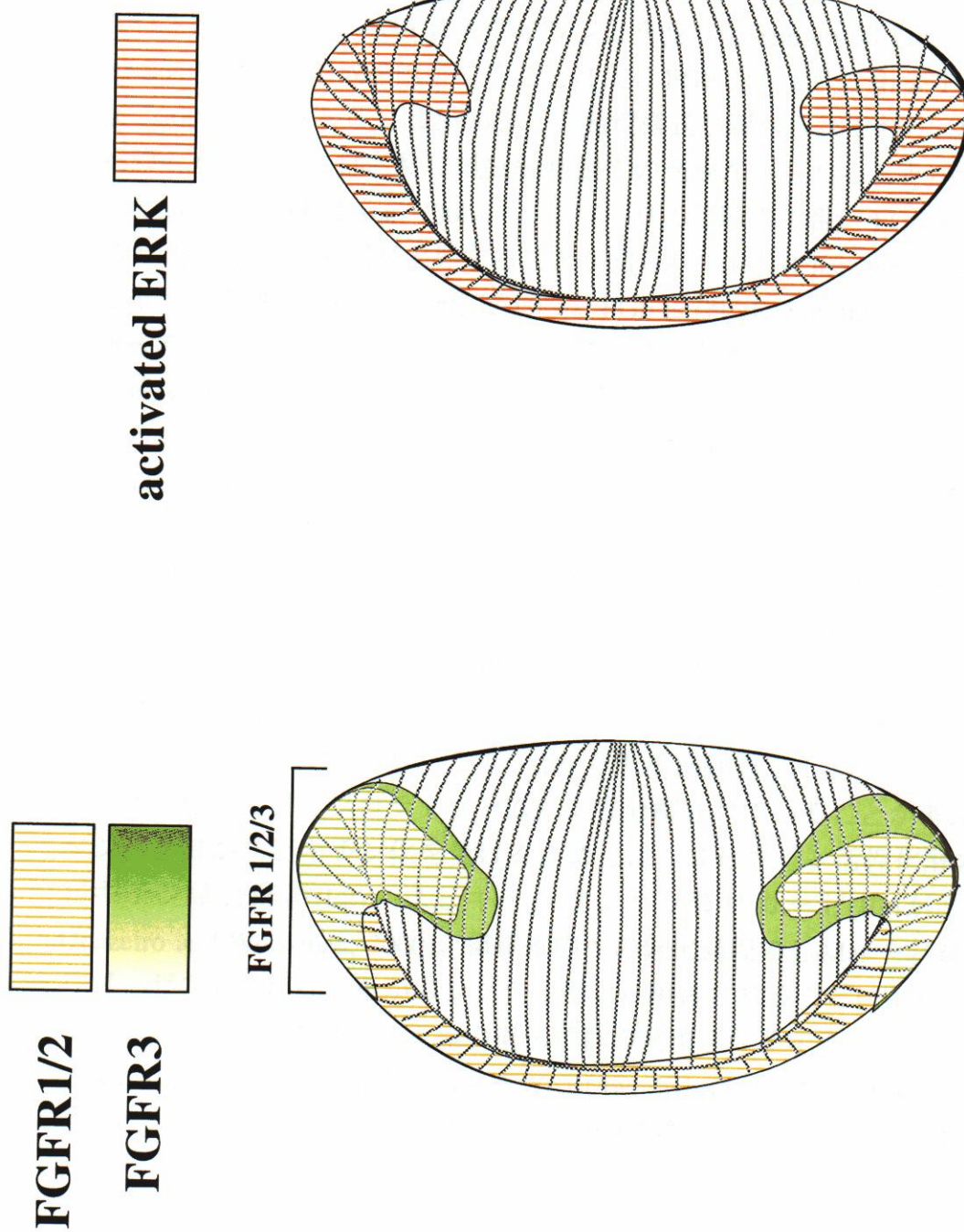


図 4-4 FGFR mRNA とリン酸化型 ERK の発現様式  
文献 : McAvoy, J. W. et. al., 1999、Lovicu, F.J. et. al., 2001 の図を改変した

L-MafがいずれのFGFレセプターの下流で機能しているのか調べることにより、L-Mafの安定性が増殖から繊維細胞への分化過程のどの細胞で調節されているのか明らかになるものと考えている。

もう一つはFGFRからのシグナルを阻害することによるFGFシグナルの調節機構が考えられる。近年、Ras/MAPKシグナルを阻害する分子としてSproutyが注目されつつある。FGF依存的にリン化を受けたSproutyはGrb2に結合し、Grb2-Sos複合体の形成を阻害することによりFGFシグナルを阻害する(Hanafusa et al., 2002)。ニワトリではSprouty2の発現様式が調べられており、眼においては網膜と水晶体の一部、特に繊維細胞側での発現がみられることが報告されている(Chambers and Mason, 2000)。ニワトリの菱脳の1番にFGF-8を強制発現するとSprouty2の発現が上昇することが知られており(Chambers et al., 2000)、上皮細胞から繊維細胞への分化においてFGF依存的にSproutyの発現が増大し、繊維細胞側でFGFシグナルをブロックすることが考えられる。

最後の可能性として、繊維細胞への分化過程でL-Mafの分解を阻害する分子メカニズムが働くことが考えられる。最近、COP9シグナルソームがタンパク質の分解を調節する複合体として働き(Schwechheimer and Deng, 2001)、ショウジョウバエの視神経細胞ではCOP9シグナルソームのサブユニットの一つであるJAB1/CSN5が発現しており、JAB1/CSN5が欠損すると視神経細胞の分化が阻害されることが報告された(Suh et al., 2002)。このことは細胞が分化する際に、タンパク質の分解を調節する機構が重要な役割を果たすことを示している。本研究においてL-Mafタンパク質の分解はプロテアソームの阻害剤により阻害されることを示した(図3-24)。このことから上皮細胞側でL-Mafタンパク質はユビキチン化を受けてプロテアソームにより分解されていることが考えられる。タンパク質がユビキチン化を受けるためには、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンタンパク質リガーゼ(E3)が必要である(Joazeiro and Weissman, 2000)。繊維細胞への分化過程でL-Mafを基質とするE3リガーゼの活性がなんらかのシグナルにより阻害されることにより、L-Mafタンパク質が核内に蓄積し、下流の遺伝子群の発現を促進することが考えられる。今後、L-Mafと相互作用する因子をYeast two-hybrid法や免疫沈降法で同定することにより、L-Mafタンパク質の分解の分子機構に迫れるものと考えている。

## 今後の展望

本研究では培養水晶体をもちいて細胞分化に関わる細胞外からのシグナルと、そのシグナルにより調節される転写因子の解析を行った。その結果、FGF

は水晶体細胞の増殖を促し且つ分化因子である L-Maf の機能を抑制することが明らかとなった。しかしながら、実際に分化するタイミングで L-Maf の活性を正に制御する機構については未だ不明なところがある。今後、FGF 以外のシグナル経路による L-Maf の機能調節や L-Maf 以外の転写因子がどのような分子メカニズムによりその活性が調節されているのか解析することにより、転写因子の時間的空間的な制御と特定の機能のみを発揮する細胞への分化機構について重大な知見が得られると期待される。

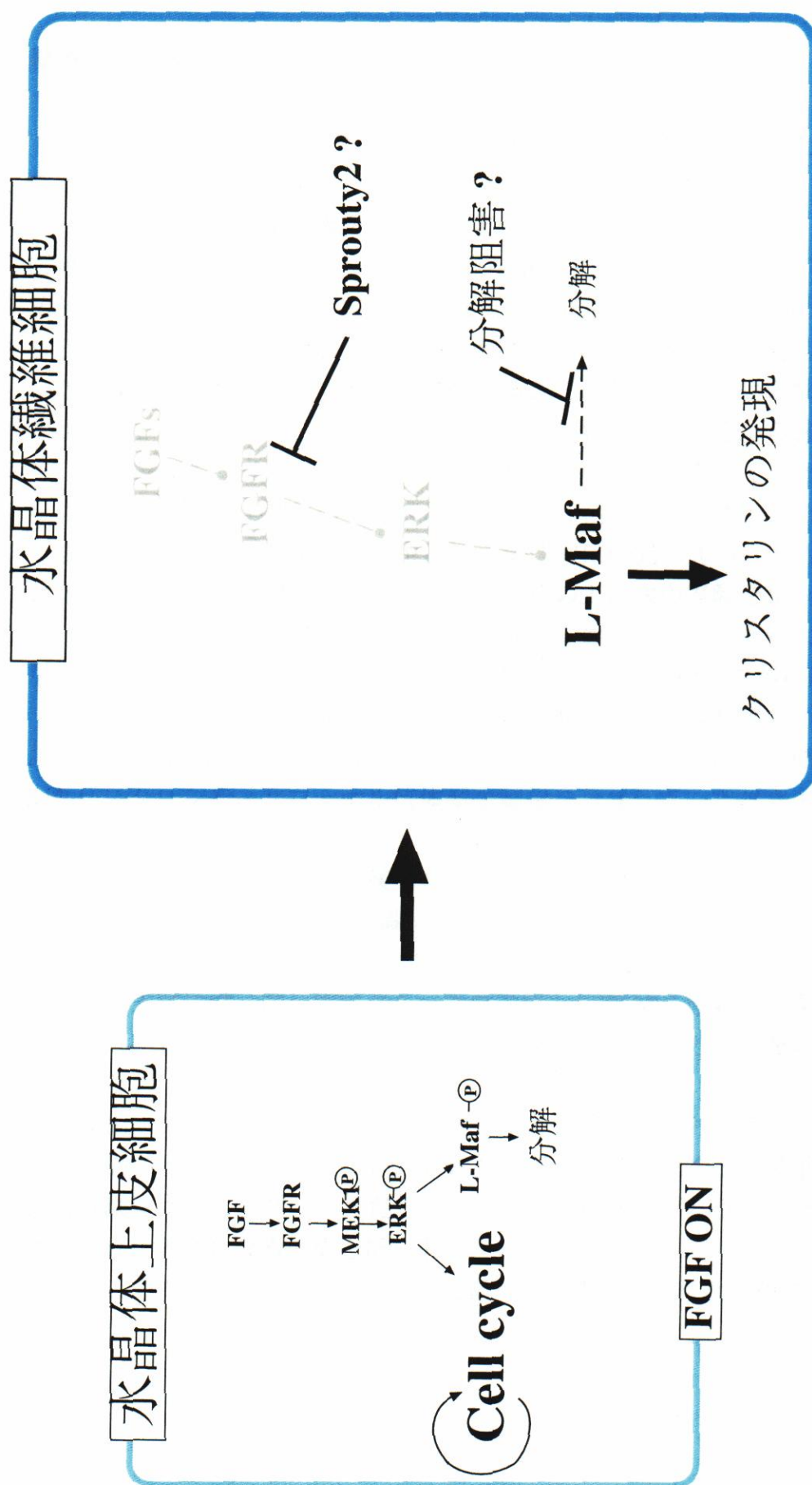


図 4-5 水晶体繊維細胞への分化のモデル  
 安定な L-Maf タンパク質は水晶体細胞への分化を促進することができる。L-Maf タンパク質の安定化には、FGF シグナルを阻害する Sprouty などの阻害因子が働く機構、や分解そのものを阻害する機構が存在するものと考えられる。

## 謝辞

研究の楽しさを学び、私が研究の道を究めることを心に決めた、この五年間に会った安田教授をはじめすべての人に感謝いたします。

安田國雄教授に深く感謝いたします。安田先生と共に過ごした5年間で、研究は時に楽しく、時に辛く厳しいものであること知りました。そこから学び、私なりの人生哲学がみえてきたような気がします。いつでも研究(人生)を楽しむということです。高橋淑子助教授は発生生物学とは何かを教えてくださいました。先生の生物学に対する哲学に触れることがなければ、生き物を研究する本当の楽しさを知ることができなかったかもしれません。心から感謝いたします。荻野肇先生には、実験手法を一から教えていただきました。ただがむしゃらに実験をする修士課程の学生であった私を、粘り強く指導していただき、深く感謝いたします。井上邦夫先生には、論理的に研究を進める大切さを教えていただきました。実験結果を深く考察し、その上に次の実験を積み上げていく楽しさを学びました。影山祐二先生には論文を仕上げるにあたり大変お世話になりました。影山先生の力強い後押しがあればこそ、最後までがんばれました。

影山龍一郎教授、小笠原直毅教授には、制度上、指導教官のいない孤児であった私の指導教官として広範に指導していただきました。江口吾郎博士には抗 $\delta$ -クリスタリンモノクローナル抗体産生細胞を分与していただきました。この場を借りて感謝いたします。

安田研究室の諸先輩方、後輩の皆さんに心から感謝します。特に前川慎吾博士には実験データや論文の議論に付き合ってくださいただけでなく、*L-maf* mRNA の発現様式のデータの転載を許可していただきました。吉田智則博士、阪上起世先輩には、同じ研究グループの先輩として Maf や網膜に関する助言をいただき、さらに我らがボス、安田教授と楽しく過ごす方法論を教えてくださいました。

安田研究室の後輩の皆さんに感謝します。皆さんのおかげで大学院生活を楽しく過ごすことができました。特に神唯君との熱い議論と三嶋雄一郎君との冷静な議論は楽しませていただきました。本当にありがとうございました。皆さんの今後のさらなる活躍を祈ります。

どこまでも自由に生きていく私を最後まで支えてくれた両親に感謝します。

## 引用文献

荻野肇 (1999) Maf 転写因子による水晶体分化制御機構の研究、京都大学学位申請論文

石橋祥子(2001) アフリカツメガエルの水晶体分化誘導過程における maf 遺伝子の発現、奈良先端科学技術大学院大学学位申請論文

吉田智則(2002) 水晶体形成過程における転写因子 Maf ファミリーの機能の比較

橘篤導(1999) 網膜及び水晶体における FGF とその受容体の発現と機能の解析 奈良先端科学技術大学院大学修士論文

大雲剛志(2001) bZip 型水晶体特異的因子 L-Maf のドメイン解析 奈良先端科学技術大学院大学修士論文

浦野充代(2002) ニワトリ水晶体誘導過程における L-Maf の機能解析 奈良先端科学技術大学院大学修士論文

水野有武 (1994) 光・眼・視覚 絵のようにみるということ 産業図書

Bruce M. Carlson, 1996. Organization of the vertebrate lens. Pattern's Foundations of Embryology sixth edition Bruce M. Carlson. McGraw-Hill, Inc (New York) pp.493

Coulombre, J. L. and Coulombre, A. J. 1963 Science 142, 1489-90

Beebe, D. C., Feagans, D. E., and Jebens, H. A. (1980). Lentropin: a factor in vitreous humor which promotes lens fiber cell differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 77, 490-3.

Beebe, D. C., Silver, M. H., Belcher, K. S., Van Wyk, J. J., Svoboda, M. E., and Zelenka, P. S. (1987). Lentropin, a protein that controls lens fiber formation, is related functionally and immunologically to the insulin-like growth factors. Proc Natl Acad Sci

U S A 84, 2327-30.

Blank, V., and Andrews, N. C. (1997). The Maf transcription factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem Sci* 22, 437-41.

Bovolenta, P., Mallamaci, A., Puelles, L., and Boncinelli, E. (1998). Expression pattern of cSix3, a member of the Six/sine oculis family of transcription factors. *Mech Dev* 70, 201-3.

Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y., and Ogryzko, V. (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* 396, 594-8.

Brewitt, B., and Clark, J. I. (1988). Growth and transparency in the lens, an epithelial tissue, stimulated by pulses of PDGF. *Science* 242, 777-9.

Chamberlain, C. G., and McAvoy, J. W. (1987). Evidence that fibroblast growth factor promotes lens fibre differentiation. *Curr Eye Res* 6, 1165-9.

Chambers, D., and Mason, I. (2000). Expression of sprouty2 during early development of the chick embryo is coincident with known sites of FGF signalling. *Mech Dev* 91, 361-4.

Chambers, D., Medhurst, A. D., Walsh, F. S., Price, J., and Mason, I. (2000). Differential display of genes expressed at the midbrain - hindbrain junction identifies sprouty2: an FGF8-inducible member of a family of intracellular FGF antagonists. *Mol Cell Neurosci* 15, 22-35.

de Jongh, R. U., Lovicu, F. J., Chamberlain, C. G., and McAvoy, J. W. (1997). Differential expression of fibroblast growth factor receptors during rat lens morphogenesis and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1688-99.

Duncan, M. K., Haynes, J. I., 2nd, Cvekl, A., and Piatigorsky, J. (1998). Dual roles for Pax-6: a transcriptional repressor of lens fiber cell- specific beta-crystallin genes. *Mol Cell Biol* 18, 5579-86.

- Furuta, Y., and Hogan, B. L. (1998). BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev* 12, 3764-75.
- Goudreau, G., Petrou, P., Reneker, L. W., Graw, J., Loster, J., and Gruss, P. (2002). Mutually regulated expression of Pax6 and Six3 and its implications for the Pax6 haploinsufficient lens phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8719-24.
- Govindarajan, V., and Overbeek, P. A. (2001). Secreted FGFR3, but not FGFR1, inhibits lens fiber differentiation. *Development* 128, 1617-27.
- Halder, G., Callaerts, P., and Gehring, W. J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267, 1788-92.
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4, 850-8.
- Hayashi, S., Goto, K., Okada, T. S., and Kondoh, H. (1987). Lens-specific enhancer in the third intron regulates expression of the chicken delta 1-crystallin gene. *Genes Dev* 1, 818-28.
- Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T., and Fisher, D. E. (1998). MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* 391, 298-301.
- Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B. L., Ton, C. C., Saunders, G. F., Hanson, I. M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. D., and van Heyningen, V. (1991). Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox- containing gene. *Nature* 354, 522-5.
- Hyatt, G. A., and Beebe, D. C. (1993). Regulation of lens cell growth and polarity by an embryo-specific growth factor and by inhibitors of lens cell proliferation and differentiation. *Development* 117, 701-9.
- Ishibashi, S., and Yasuda, K. (2001). Distinct roles of maf genes during *Xenopus* lens development. *Mech Dev* 101, 155-66.

- Jean, D., Ewan, K., and Gruss, P. (1998). Molecular regulators involved in vertebrate eye development. *Mech Dev* 76, 3-18.
- Joazeiro, C. A., and Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-52.
- Kajihara, M., Kawauchi, S., Kobayashi, M., Ogino, H., Takahashi, S., and Yasuda, K. (2001). Isolation, characterization, and expression analysis of zebrafish large Mafs. *J Biochem (Tokyo)* 129, 139-46.
- Kamachi, Y., Sockanathan, S., Liu, Q., Breitman, M., Lovell-Badge, R., and Kondoh, H. (1995). Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *Embo J* 14, 3510-9.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R., and Kondoh, H. (1998). Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* 125, 2521-32.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Tanouchi, A., Sekido, R., and Kondoh, H. (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev* 15, 1272-86.
- Kao, S., Jaiswal, R. K., Kolch, W., and Landreth, G. E. (2001). Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 276, 18169-77.
- Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270, 16483-6.
- Kataoka, K., Nishizawa, M., and Kawai, S. (1993). Structure-function analysis of the maf oncogene product, a member of the b-Zip protein family. *J Virol* 67, 2133-41.
- Kataoka, K., Noda, M., and Nishizawa, M. (1996). Transactivation activity of Maf nuclear oncoprotein is modulated by Jun, Fos and small Maf proteins. *Oncogene* 12, 53-

Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E., and Sherr, C. J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 7, 331-42.

Kawauchi, S., Takahashi, S., Nakajima, O., Ogino, H., Morita, M., Nishizawa, M., Yasuda, K., and Yamamoto, M. (1999). Regulation of lens fiber cell differentiation by transcription factor c- Maf. *J Biol Chem* 274, 19254-60.

Kim, J. I., Li, T., Ho, I. C., Grusby, M. J., and Glimcher, L. H. (1999). Requirement for the c-Maf transcription factor in crystallin gene regulation and lens development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3781-5.

Kondoh, H. (1999). Transcription factors for lens development assessed in vivo. *Curr Opin Genet Dev* 9, 301-8.

Le, A. C., and Musil, L. S. (2001). FGF signaling in chick lens development. *Dev Biol* 233, 394-411.

Li, L., Zhou, J., James, G., Heller-Harrison, R., Czech, M. P., and Olson, E. N. (1992). FGF inactivates myogenic helix-loop-helix proteins through phosphorylation of a conserved protein kinase C site in their DNA- binding domains. *Cell* 71, 1181-94.

Lovicu, F. J., and McAvoy, J. W. (2001). FGF-induced lens cell proliferation and differentiation is dependent on MAPK (ERK1/2) signalling. *Development* 128, 5075-84.

Lovicu, F. J., and Overbeek, P. A. (1998). Overlapping effects of different members of the FGF family on lens fiber differentiation in transgenic mice. *Development* 125, 3365-77.

Maegawa, S., Yasuda, K., and Inoue, K. (1999). Maternal mRNA localization of zebrafish DAZ-like gene. *Mech Dev* 81, 223-6.

Marais, R., Wynne, J., and Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1

contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73, 381-93.

Maruno, K. A., Lovicu, F. J., Chamberlain, C. G., and McAvoy, J. W. (2002). Apoptosis is a feature of TGF beta-induced cataract. *Clin Exp Optom* 85, 76-82.

Matsuo, I., Kitamura, M., Okazaki, K., and Yasuda, K. (1991). Binding of a factor to an enhancer element responsible for the tissue-specific expression of the chicken alpha A-crystallin gene. *Development* 113, 539-50.

Matsuo, I., and Yasuda, K. (1992). The cooperative interaction between two motifs of an enhancer element of the chicken alpha A-crystallin gene, alpha CE1 and alpha CE2, confers lens-specific expression. *Nucleic Acids Res* 20, 3701-12.

McAvoy, J. W., and Chamberlain, C. G. (1989). Fibroblast growth factor (FGF) induces different responses in lens epithelial cells depending on its concentration. *Development* 107, 221-8.

McAvoy, J. W., Chamberlain, C. G., de Iongh, R. U., Hales, A. M., and Lovicu, F. J. (1999). Lens development. *Eye* 13, 425-37.

McAvoy, J. W., and Fernon, V. T. (1984). Neural retinas promote cell division and fibre differentiation in lens epithelial explants. *Curr Eye Res* 3, 827-34.

Menko, A. S., Klukas, K. A., and Johnson, R. G. (1984). Chicken embryo lens cultures mimic differentiation in the lens. *Dev Biol* 103, 129-41.

Motohashi, H., Shavit, J. A., Igarashi, K., Yamamoto, M., and Engel, J. D. (1997). The world according to Maf. *Nucleic Acids Res* 25, 2953-59.

Murata, T., Nitta, M., and Yasuda, K. (1998). Transcription factor CP2 is essential for lens-specific expression of the chicken alphaA-crystallin gene. *Genes Cells* 3, 443-57.

Musti, A. M., Treier, M., and Bohmann, D. (1997). Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* 275, 400-2.

Nishiguchi, S., Wood, H., Kondoh, H., Lovell-Badge, R., and Episkopou, V. (1998). Sox1 directly regulates the gamma-crystallin genes and is essential for lens development in mice. *Genes Dev* 12, 776-81.

Nishizawa, M., Kataoka, K., Goto, N., Fujiwara, K. T., and Kawai, S. (1989). v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7711-5.

Ogino, H., and Yasuda, K. (1998). Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-Maf. *Science* 280, 115-8.

Okada, T. S., Eguchi, G., and Takeichi, M. (1971). The expression of differentiation by chicken lens epithelium in in vitro cell culture. *Dev Growth Differ* 13, 323-36.

Oliver, G., Loosli, F., Koster, R., Wittbrodt, J., and Gruss, P. (1996). Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene Six3. *Mech Dev* 60, 233-9.

Oliver, G., Sosa-Pineda, B., Geisendorf, S., Spana, E. P., Doe, C. Q., and Gruss, P. (1993). Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech Dev* 44, 3-16.

Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., and Gehring, W. J. (1994). Homology of the eyeless gene of Drosophila to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* 265, 785-9.

Reneker, L. W., and Overbeek, P. A. (1996). Lens-specific expression of PDGF-A alters lens growth and development. *Dev Biol* 180, 554-65.

Reza, H. M., Ogino, H., and Yasuda, K. (2002). L-Maf, a downstream target of Pax6, is essential for chick lens development. *Mech Dev* 116, 61-73.

Ring, B. Z., Cordes, S. P., Overbeek, P. A., and Barsh, G. S. (2000). Regulation of mouse lens fiber cell development and differentiation by the Maf gene. *Development* 127, 307-17.

Schatteman, G. C., Morrison-Graham, K., van Koppen, A., Weston, J. A., and Bowen-Pope, D. F. (1992). Regulation and role of PDGF receptor alpha-subunit expression during embryogenesis. *Development* *115*, 123-31.

Schulz, M. W., Chamberlain, C. G., de Iongh, R. U., and McAvoy, J. W. (1993). Acidic and basic FGF in ocular media and lens: implications for lens polarity and growth patterns. *Development* *118*, 117-26.

Schwechheimer, C., and Deng, X. W. (2001). COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol* *11*, 420-6.

Shaywitz, A. J., and Greenberg, M. E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* *68*, 821-61.

Shirke, S., Faber, S. C., Hallem, E., Makarenkova, H. P., Robinson, M. L., Overbeek, P. A., and Lang, R. A. (2001). Misexpression of IGF-I in the mouse lens expands the transitional zone and perturbs lens polarization. *Mech Dev* *101*, 167-74.

Stolen, C. M., Jackson, M. W., and Griep, A. E. (1997). Overexpression of FGF-2 modulates fiber cell differentiation and survival in the mouse lens. *Development* *124*, 4009-17.

Strom, A., Castella, P., Rockwood, J., Wagner, J., and Caudy, M. (1997). Mediation of NGF signaling by post-translational inhibition of HES-1, a basic helix-loop-helix repressor of neuronal differentiation. *Genes Dev* *11*, 3168-81.

Suh, G. S., Poeck, B., Chouard, T., Oron, E., Segal, D., Chamovitz, D. A., and Zipursky, S. L. (2002). *Drosophila* JAB1/CSN5 acts in photoreceptor cells to induce glial cells. *Neuron* *33*, 35-46.

Treier, M., Staszewski, L. M., and Bohmann, D. (1994). Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* *78*, 787-98.

Wawersik, S., Purcell, P., Rauchman, M., Dudley, A. T., Robertson, E. J., and Maas, R.

(1999). BMP7 acts in murine lens placode development. *Dev Biol* 207, 176-88.

Wegner, M. (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27, 1409-20.

Wigle, J. T., Chowdhury, K., Gruss, P., and Oliver, G. (1999). Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat Genet* 21, 318-22.

Wu, M., Hemesath, T. J., Takemoto, C. M., Horstmann, M. A., Wells, A. G., Price, E. R., Fisher, D. Z., and Fisher, D. E. (2000). c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev* 14, 301-12.

Yang, X., Su, K., Roos, M. D., Chang, Q., Paterson, A. J., and Kudlow, J. E. (2001). O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6611-6.

Yang, X., Zhang, F., and Kudlow, J. E. (2002). Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell* 110, 69-80.

Yoshida, K., Kim, J. I., Imaki, J., Hiromi, I., Nishi, S., Matsuda, H., Harada, T., Harada, C., Ohno, S., and Sakai, M. (2001). Proliferation in the posterior region of the lens of c-maf<sup>-/-</sup> mice. *Curr Eye Res* 23, 116-9.

Yoshida, S., Fujisawa-Sehara, A., Taki, T., Arai, K., and Nabeshima, Y. (1996). Lysophosphatidic acid and bFGF control different modes in proliferating myoblasts. *J Cell Biol* 132, 181-93.

Yoshida, T., and Yasuda, K. (2002). Characterization of the chicken L-Maf, MafB and c-Maf in crystallin gene regulation and lens differentiation. *Genes Cells* 7, 693-706.