

論文内容の要旨

申請者氏名 越智 陽城

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 δ -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 δ -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える。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 越智 陽城

高等動物の器官形成においては、誘導現象をはじめとした組織間・細胞間の相互作用が重要な役割を果たすことが知られている。脊椎動物の水晶体形成においても、水晶体上皮細胞から水晶体繊維細胞への分化に網膜からの誘導シグナルが重要な働きをしていることが組織培養系を用いた研究により明らかにされている。fibroblast growth factor 2 (FGF-2) は水晶体形成における分化誘導を仲介する分子の一つであり、水晶体繊維細胞の分化を促進することが明らかにされているが、その生物学的機能の分子基盤についてはほとんど解析されてこなかった。

本論文において申請者は、FGF-2 の作用点の一つが basic/leucine zipper 型転写因子である L-Maf のリン酸化であることを、組換えタンパク質を用いたリン酸化検定法および水晶体初代培養系と転写活性化のレポーター遺伝子とを組み合わせた実験により示し、さらにリン酸化型 L-Maf がプロテオソーム依存的に分解されることをプロテオソーム特異的な阻害剤を用いることにより明らかにした。L-Maf は水晶体に特異的に発現する転写因子であり、水晶体細胞の分化を制御することが知られていたが、上記の結果は FGF-2 を介した組織間の相互作用により分化決定因子である L-Maf の活性が直接制御されているということを強く示唆している。また、申請者はリン酸化を受けない変異型の L-Maf タンパク質の強制発現が水晶体細胞の分化を促進することを見いだしており、リン酸化/分解による L-Maf の活性制御が実際に水晶体繊維細胞の分化に重要であると考えられた。これらのリン酸化による L-Maf のタンパク質安定性の制御機構は、L-Maf および活性型 MAP キナーゼに対する特異抗体を用いた免疫染色により示された、水晶体における L-Maf の発現様式ともよく一致していた。

本論文の新規性・重要性は、細胞間シグナルである FGF-2 が転写因子である L-Maf のリン酸化を制御することにより水晶体形成を制御しているという点につきるが、このことは水晶体形成のみならず、器官形成における細胞間相互作用がいかにして遺伝子発現に影響を及ぼすかを理解する上で重要な知見であり、当該分野への貢献度は高い。また、本研究は申請者の独創的なアイデアと確かな実験技術に基づいて行われたものであり、学位にふさわしい資質を備えていると判断する。これらのことを鑑みて、審査委員一同は本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。