

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所 属 (主指導教官)	バイオサイエンス研究科分子生物学専攻 (安田 國雄 教授)		
氏 名	梶原 美和子	提 出	平成12年7月26日
題 目	ゼブラフィッシュ胚発生過程における large Mafの発現および機能解析		
要旨 胚発生過程における細胞の分化および形態形成は、細胞内の分子変化に起因する現象である。分子変化の最も基本的な事象は「転写制御」であり、その制御を担う転写因子について、多くの研究者によって解析がなされてきた。我々の研究グループにおいては、ニワトリの筋腱膜線維肉腫の原因遺伝子としてAS42レトロウイルスより同定されたv-Mafに由来するMafファミリーについて解析を行ってきた。近年、Mafファミリーは脊椎動物の発生過程において、細胞の分化や形態形成に重要な役割を担うことが示されるようになり、発生・分化の観点にたった解析が必要となってきた。そこで本研究では、発生・分化の研究に有利なゼブラフィッシュを実験対象動物としてMafを単離し、それらゼブラフィッシュMafの胚発生過程における発現解析、<i>in vitro</i>における機能解析、およびインジェクション法を用い、過剰発現による生体内での機能解析を行った。 第一節ではゼブラフィッシュMafの単離とそれらの発現パターンについて記述した。ゼブラフィッシュにおいても哺乳類や鳥類で報告されているMafBおよびc-Mafと高い一致性を持った配列が得られ、それら発現パターンには他の動物との相似性が認められた。この結果はMafが魚類にも存在することを明示し、脊椎動物間共通の機能を持つことを示唆している。水晶体においてはc-Mafの発現はマウスとゼブラフィッシュ間で一致している一方、MafBの発現には明らかな違いが認められた。この結果はマウスとゼブラフィッシュの水晶体形成様式の違いによるものと考えられた。さらに、SMaf1 (Somite Maf 1)とSMaf2 (Somite Maf2)を単離することができた。これらSMafsはいずれも既知のlarge Mafでは観察されないパターンで体節において強く発現する。SMafsの体節における発現パターンは筋分化			

の制御タンパク質である転写因子MyoDの発現パターンと類似していた。MyoDの発現パターンと詳細に比較するとSMafsは筋細胞の成熟に伴って発現しており、特にSMaf1は筋分化・形成過程に伴った発現パターンを持つことが明らかになった。SMaf1のアミノ酸配列はニワトリL-Mafと最も高い一致性を示すにも関わらず、SMaf1の水晶体における発現は観察されなかった。ほかのゼブラフィッシュ large Mafの発現パターンについても解析を行ったところ、c-Maf、MafBやSMafsの関係と同様に発現領域に重複性が認められた。第二節ではSMafsの性質について述べる。培養細胞を用いたルシフェラーゼ解析およびEMSA (electrophoretic gel mobility shift assay) によって、SMafsはMARE (Maf recognition element)と重複した配列を持つ α CE2 (chicken L-Maf binding sequence)を介した転写活性化能を示した。acidic domainを欠失させたSMafsの構築ではいずれでもこの転写活性化能を失うことから、SMafsにおいてacidic domainが転写活性化能を担うことが明らかになった。第三節では筋分化・形成の過程におけるSMaf1の機能解析の結果をまとめた。ゼブラフィッシュ胚へのSMaf1 DNAのインジェクションによって、発現領域および発現時期を制御しつつ、筋細胞でSMaf1を過剰発現させたところ体節形成の異常が観察された。SMaf1DNAを筋細胞に過剰発現させた胚は、孵化後10日以上生存するものの、正常に泳ぎ回ることができず身体をわずかに震わせるという行動異常が認められた。これらSMaf1過剰発現胚について詳細な解析を行った結果、MyoDの発現が減少した細胞群が観察され、第一次運動神経から筋肉への軸索伸展も正常に行われていなかった。つまりSMaf1の過剰発現によって筋制御が負に傾いたため、正常な筋分化がなされず、その結果として運動神経軸索伸展に異常をきたし、行動異常にいたると考えられた。さらに細胞レベルで観察すると、発生過程が進行してもSMaf1過剰発現細胞は明らかに筋繊維を形成せず、筋芽細胞様の丸い形態のままであった。これらより、SMaf1の機能の一つとして筋分化・形成の抑制が推察され、筋分化とlarge Mafの新たな関係が示唆された。以上のデータに基づいて、ニワトリL-Mafホモログである、SMaf1の筋分化・形成過程における機能をこれまでの知見とあわせて予測する。SMaf1と筋分化、およびそのカスケードに関与する遺伝子群との関係において、DNAと相互作用しない large Maf機能の可能性について述べたい。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 梶原 美和子

Maf は bZIP 型転写因子であり、種々の動物の初期形態形成に関わっていることが明らかにされている。特に、L-Maf は水晶体形成過程に関わる遺伝子として、その機能解析が行われている。水晶体形成過程が、魚類はニワトリやカエルとは異なっていることが知られている。本論文は、遺伝学的解析が可能なモデル生物ゼブラフィッシュを用いて、Maf 関連遺伝子のクローニングと、その機能解析を目的とし、発現パターンの解析、レポーターアッセイと遺伝子導入により、以下の点を明らかにしている。

1. RT-PCR 法を用いてゼブラフィッシュからの 4 つの Maf 遺伝子 MafB、c-Maf, SMaf1, SMaf2 を単離し、種々の動物の Maf 遺伝子とアミノ酸配列を比較し、Maf 遺伝子の系統樹による分類を明らかにした。MafB はマウスやニワトリで知られている菱脳、前腎で、c-Maf は水晶体上皮細胞で発現することを明らかにした。また、SMaf1 が L-Maf と相同性が最も高いにも関わらず、水晶体には全く発現せず、体節に最も高い発現が見られることを初めて明らかにした。体節に発現する MyoD 遺伝子との発現パターンの比較から、筋細胞の成熟に伴って発現し、筋分化形成過程に関与していることを示した。
2. ゼブラフィッシュ SMaf が転写因子としての機能をもっていることをレポーターアッセイとゲル移動度シフト法により明らかにした。ゲル移動度シフト法によりニワトリの L-Maf と同じく SMaf は、TGCTGAC 配列に特異的に結合し、この配列を介し転写活性を促進すること、SMaf1 は SMaf2 より転写活性促進活性が数倍高いことを明らかにした。
3. 体節で特異的に発現するプロモーターの下流に SMaf1 を連結し、ゼブラフィッシュ胚へ遺伝子導入し、体節での SMaf1 の機能を解析している。SMaf1 の過剰発現により、体節形成の異常、MyoD 発現細胞の減少、運動神経の筋肉への軸索進展異常を認めている。また、細胞レベルでの詳細な解析から、SMaf1 の過剰発現細胞が筋繊維を形成できず、筋芽細胞のまま存在していることを明らかにしている。

以上のように、本論文は、ゼブラフィッシュの水晶体分化と体節形成の過程で発現する Maf 遺伝子を同定し、その機能を解析している。特に、体節で発現する SMaf1 遺伝子を初めて同定し、その機能解析から、筋形成分化に関わることを明らかにした点は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、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。