所属 (主指導教官)	分子発生生物学講座 (小笠原 直毅 教授)		
氏名	吉田 知則	提出	平成14年1月8日
題目	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解析		

要旨

水晶体は一層の水晶体上皮細胞と繊維細胞との2種類の細胞群からなる単純な組織である。上皮細胞は増殖して一部は繊維細胞へと最終分化する。水晶体には水晶体固有の性質である透明性に関わる *crystallin* 遺伝子群が特異的に発現している。水晶体細胞分化の分子機構はこの *crystallin* 遺伝子の発現調節機構の解析を通して近年急速に解明されつつある。水晶体形成過程において bZIP 型転写因子 L-Maf が重要な役割を果たすことがニワトリで明らかにされた。すなわち *L-maf* は水晶体特異的発現を示し、*L-maf* の強制発現により培養神経性網膜細胞においては種々の *crystallin* 遺伝子の発現が認められるようになり、水晶体細胞に分化転換する。その後 *c-maf* 欠損マウスにおいて水晶体繊維細胞の形成不全が明らかにされた。さらにカエルでは *L-maf* と *mafB* とがそれぞれ水晶体繊維細胞と上皮細胞とに分かれて発現しており、アニマルキックアッセイにおいて標的遺伝子も異なることが報告された。これらのことから Maf は水晶体形成において *L-maf* だけでなく、*mafB* や *c-maf* を含むファミリーで機能していると考えられる。ファミリーメンバーそれぞれの役割を明らかにすることは水晶体形成の分子機構の解明に繋がると考えられた。

そこで、ニワトリ L-Maf、MafB、c-Maf を用いて Maf ファミリー間での転写因子としての性質を比較してそれぞれを特徴づける事を目的とし研究を行った。

まず発生途上のニワトリ胚において *L-maf*、*mafB*、*c-maf* が水晶体に発現している事を、*in situ* hybridization 法、ノザン法を用いて確認した。次にレポーター遺伝子を用いた転写活性化能を比較した。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と Maf 発現プラスミドとを一過的に培養細胞に共導入して Maf の転写活性化能を調べた。すると MafB、c-Maf は L-Maf の活性より約10倍高いという結果を得た。このことから、MafB、c-Maf は L-Maf よりも強い転写活性を持つことが明かとなった。

さらにこのような L-Maf と MafB あるいは c-Maf との転写活性化能の違いが、Maf のどの領域に依存しているのかを調べることにした。

そこで L-Maf、MafB、c-Maf でキメラ Maf 発現プラスミドを構築しレポーターアッセイで調べた。すると強い MafB の活性に関しては DNA 結合領域がその責任領域である事が分かった。一方 c-Maf は MafB の場合とは逆に転写活性化領域がその責任領域であることが分かった。このことは MafB と c-Maf とは同程度の活性を示すにも関わらず、その活性を発揮する機構は異なることを示している。

Maf の転写因子としての性質の差は明らかにされたので、次に水晶体形成においてどのように発揮されるのかを調べた。 α A-crystallin 遺伝子の水晶体特異的プロモーターを用いたレポーターアッセイでは、L-Maf、MafB、c-Maf には顕著な差は見られなかった。一方、培養神経性網膜細胞を用いて Maf の δ -crystallin 遺伝子の異所的発現誘導能を調べた。すると L-Maf は低い転写活性化能にも関わらず、MafB、c-Maf よりも高い δ -crystallin 誘導能を示した。これらのことは単独では弱い活性しか示さない L-Maf の転写活性化能はプロモーター上で他の因子と相互作用することで高い活性を示すようになることを示唆している。また L-Maf と c-Maf とのキメラ Maf を用いた解析から L-Maf の高い δ -crystallin 誘導活性は L-Maf の転写活性化領域にあることが明かとなった。さらに L-Maf の様々な欠質変異体を用いて δ -crystallin 誘導活性を調べると L-Maf の 92 番目から 132 番目までの領域にその活性を持つ領域を絞り込むことができた。その領域には確かに L-Maf に固有のアミノ酸配列が含まれており、L-Maf にのみ高い δ -crystallin 誘導能があることと一致していた。

水晶体形成過程において Maf が関与していることはこれまでの研究で明かとなっていた。そして本研究により L-Maf、MafB、c-Maf の転写因子としての性質に関して、異なる活性を検出、その責任領域を同定することができた。このことは水晶体形成において、どのような違いが標的遺伝子の質的な、あるいは量的な違いを生み出すのかの分子機構を考える上での重要な知見であると考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 吉田 知則

水晶体は、発生分化機構を研究する有効な実験系である。これまでの研究から、bZIP型転写因子をコードする Maf 蛋白質が水晶体形成過程に中心的役割を果たすことが示されてきた。ニワトリ水晶体形成過程においては、*L-maf* 遺伝子が α A-crystallin などの水晶体分化マーカー遺伝子の発現を制御し、その強制発現により培養神経性網膜細胞が水晶体細胞に分化転換することが明らかにされている。さらに、水晶体形成過程には、L-Maf に加えて、MafB や c-Maf を含む Maf ファミリーとして機能していると考えられるものの、それぞれの役割については不明であった。そこで、本研究では、ニワトリ L-Maf、MafB、c-Maf を用いて Maf ファミリー間での転写因子としての性質を比較してそれぞれを特徴づける事を目的とした。まずニワトリ胚において *L-maf*、*mafB*、*c-maf* が水晶体に発現している事を確認した。次に、Maf の認識配列を6つ連結したレポーター遺伝子を用いて転写活性可能を比較したところ、MafB、c-Maf は L-Maf よりも約10倍高い転写活性を持つことが明らかとなった。それぞれの *maf* 遺伝子間でキメラコンストラクトを作成し、レポーターアッセイを行った結果、MafB の強い転写活性化能に関しては DNA 結合領域が、c-Maf の強い転写活性化能に関しては転写活性化領域がその責任領域であることが明らかとなった。一方、 α A-crystallin 遺伝子の水晶体特異的プロモーターを用いたレポーターアッセイでは、各 Maf 蛋白質の活性に顕著な差は見られなかった。さらに、培養神経性網膜細胞を用いて δ -crystallin 遺伝子の異所的発現誘導能を調べたところ、各 Maf 蛋白質の中で L-Maf が最も高い発現誘導能を示した。このような L-Maf の特性は、転写活性化領域に担われていた。従って、単独では弱い転写活性しか示さない L-Maf は、プロモーター上で他の因子との相互作用を介して高い活性を発揮するものと考えられる。

以上のように、本論文は水晶体形成過程に働く転写制御因子 Maf 蛋白質ファミリーのそれぞれの特性をはじめて浮き彫りにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、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。