

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 分子発生生物学講座 (小笠原 直毅 教授)		
氏名	Hasan Mahmud Reza	提出	平成14年 1月 8日
題目	The role of Pax6 and L-Maf in chick lens development		

要旨

During lens development in vertebrates, the orchestration of multiple transcriptional regulators is essential for fate determination and terminal differentiation. In early development, Pax6, Sox2 and Six3 are expressed both in the head ectoderm and optic vesicle, while L-Maf, Prox1 and crystallins are expressed at a later stage in the lens placode in a more restricted fashion. To uncover the genetic interactions among these factors during lens development, I first examined the effects of dominant-negative molecules of Pax6 and L-Maf, which play decisive roles in lens formation. The two dominant-negative isoforms of Pax6 overexpressed in presumptive lens ectoderm repress *L-maf*, *Prox1* and δ -*crystallin* expression, resulting in failure of lens formation. These effects of dominant-negative Pax6 are fully rescued by co-expression with wild-type L-Maf. In addition, dominant-negative L-Maf inhibits the expression of *Prox1* and δ -*crystallin*, while misexpression of L-Maf causes ectopic induction of these genes. These results demonstrate that L-Maf is a downstream target of Pax6 and mediates Pax6 activity in developing lens cells.

Then I concentrated my focus on Pax6 expressed in optic vesicle. *Pax6* is fairly expressed in head ectoderm and optic vesicle in an aberrant temporal pattern. It was known that Pax6 expressed in optic vesicle play role in retina development but not in lens development. To identify any additional role of this Pax6 in lens development, I overexpressed dominant-negative form of regular Pax6 isoform in developing optic vesicle. Thus, targeted deletion of Pax6 in optic vesicle reveals that lens development is arrested at lens vesicle stage along with optic cup deformation. The malformed lens shows clear expression of crystallins although L-Maf and Prox1 are down-regulated. I found that *crystallin* expression was due to c-Maf function and residual activity of L-Maf that expressed earlier but prematurely arrested. These results demonstrate that Pax6 function in optic vesicle is essential for the maintenance of *L-maf* expression in lens cells through ensuring necessary signaling from optic cup to developing lens and thereby triggers fiber differentiation.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Hasan Mahmud Reza

脊椎動物のレンズの発生において、表皮外胚葉の一部であるレンズ予定領域は、眼胞（眼原基）を構成する神経性網膜からの誘導を受け、プラコード形成および陥入を経てレンズ細胞へと分化することが知られている。本論文において申請者は、ニワトリ胚を用いてレンズ予定領域および神経性網膜における *Pax6* 遺伝子の機能を解析し、*Pax6* 遺伝子が両方の組織において活性を持つことが正常なレンズの発生に不可欠であることを示した。

多くの生物種において *Pax6* は眼形成に必須であり、眼形成のマスター遺伝子であると考えられている。初期発生において *Pax6* は、レンズ予定領域を含む表皮外胚葉および神経性網膜の両方において発現する。レンズ細胞でのみ *Pax6* を欠損させた条件的ノックアウトマウスではレンズ形成が起こらないことから、レンズ細胞における *Pax6* の発現がレンズ形成に必須であることが示されている。神経性網膜細胞における発現については、*Pax6* が網膜細胞の分化に必須であることが示されているが、レンズ形成におけるその役割は明らかにされていなかった。本論文では、マイクロエレクトロポレーション法によりドミナントネガティブ変異型 *Pax6* 蛋白質をニワトリ胚レンズ予定領域もしくは神経性網膜に特異的に発現させ、それぞれの組織における *Pax6* の機能を詳細に解析した。その結果、レンズ予定領域における *Pax6* 活性がレンズの陥入および *Prox1* および δ -crystallin の発現に必須であること、レンズ細胞の分化に重要な役割を果たす転写因子 *L-maf* が *Pax6* および *Sox2* の両者による協調作用により誘導されることを明らかにした。さらに、*L-maf* も同様にレンズの陥入および *Prox1* および δ -crystallin の発現に必須であり、レンズ予定領域における *Pax6* の機能発現は *L-maf* の活性化を通して行われることを示した。一方、神経性網膜細胞における *Pax6* の活性はレンズの誘導に必須であり、*Pax6* が誘導シグナルの制御に関わる可能性を示した。また、レンズ予定領域における *L-maf* の発現は神経性網膜における *Pax6* の活性に依存しており、神経性網膜において *Pax6* が発現することにより、何らかの誘導シグナルを介してレンズ予定領域での *L-maf* の発現を誘導し、レンズ形成を制御していると考えられた。興味深いことに *L-maf* とのパラログである *c-maf* は、*L-maf* とは異なり、神経性網膜での *Pax6* の活性に非依存的に制御されていることが示された。

以上のように、本論文は *Pax6* および *L-maf* を中心とした眼形成における分子カスケードを明らかにしたものであり、学術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。