

所 属 (主指導教官)	分子発生生物学講座 (安田 國雄 教授)		
氏 名	石橋 祥子	提 出	平成12年 1月 6日
題 目	アフリカツメガエルの水晶体誘導過程における <i>maf</i> 遺伝子の発現		
要旨 水晶体形成過程は、誘導による細胞分化のメカニズムを解明する上でよいモデル系である。本研究室では、水晶体の主要構成タンパク質であるαA-クリスタリンの水晶体特異的な発現を制御するエンハンサー領域に結合する因子、L-Mafを同定した。ニワトリ <i>L-maf</i> 遺伝子は bZIP モチーフを持つ転写因子をコードし、水晶体プラコードから水晶体特異的に発現する。本研究では、アフリカツメガエル の <i>maf</i> 遺伝子をクローニングし、水晶体形成過程における <i>maf</i> 遺伝子の発現と機能の解析をおこなった。 RT-PCR、cDNA スクリーニングによってアフリカツメガエル の 2つの <i>maf</i> 遺伝子、<i>XmafB</i>、<i>XL-maf</i> を単離した。ホールマウント <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションによって初期発生過程における発現パターンを調べたところ、組織特異的な発現が観察された。とくに水晶体形成過程において、<i>XmafB</i>、<i>XL-maf</i> 遺伝子は、時期・領域特異的な発現を示した。<i>XmafB</i> は眼胞が外胚葉に接触するステージ22の予定水晶体領域で、<i>XL-maf</i> はやや遅れた、水晶体プラコードが肥厚し始める直前のステージ24の予定水晶体領域で発現し始める。二重染色をおこなうと、<i>XmafB</i> の発現領域は、<i>XL-maf</i> の発現領域よりやや広いことが分かった。その後どちらも水晶体プラコードで発現し、水晶体プラコードが外胚葉から分離しつつあるステージ32では、<i>XmafB</i> は外胚葉と水晶体プラコードの境界上に、<i>XL-maf</i> は後に水晶体繊維細胞となる水晶体プラコードの網膜側の領域に発現するようになる。水晶体プラコードが外胚葉から完全に分離して水晶体が形成されると、<i>XmafB</i> は細胞分裂をおこなう水晶体上皮細胞に、<i>XL-maf</i> はクリスタリンタンパク質で満たされ繊維状に分化する水晶体繊維細胞に発現していた。以上の結果から、<i>XmafB</i> は水晶体上皮細胞の増殖と分化に、<i>XL-maf</i> は水晶体繊維細胞の分化に関わっていると考えられる。 水晶体形成過程における <i>maf</i> 遺伝子の機能を調べるため、マイクロインジェクションによる <i>maf</i> 遺伝子の過剰発現をおこなった。<i>XmafB</i>、<i>XL-maf</i> の mRNA をインジェクションしたアニマルキャップでは、水晶体の初期マーカーであるβ4A-、γ-クリスタリンの発現が誘導された。一方、後期に発現するαA-クリスタリンの発現は誘導されなかった。胚においてインジェクションをおこなうと、異所的なγ-クリスタリンの発現がみられた。しかし、水晶体様の構造物は観察されなかった。そのため、<i>XmafB</i>、<i>XL-maf</i> 遺伝子は、水晶体誘導の初期過程でβ4A-、γ-クリスタリンの発現を制御していると考えられる。			

アフリカツメガエル胚では移植実験によって、水晶体の誘導・分化には数段階からなる組織間相互作用が必要であることが明らかになっている。しかし、それぞれの時期と場所に発現するマーカー遺伝子が得られていないため、その分子機構の解明は不可能であった。上述のような *maf* 遺伝子の発現パターンから、*XmafB*、*XL-maf* 遺伝子は眼胞からのシグナルを受ける前と後でそれぞれ発現が誘導されると考えられる。そこで、*maf* 遺伝子の発現が水晶体誘導過程においてどのような制御を受けているかを調べるため、眼胞除去によって生じる free lens での *maf* 遺伝子の発現を調べた。ステージ18胚の将来眼胞を生じる頭部神経板を除去すると、繊維状に分化はしていないがγ-クリスタリン陽性の小さな水晶体様細胞塊が形成される。その free lens において *XmafB* の発現はみられたが、*XL-maf* の発現はみられなかった。ところが、わずかでも網膜組織が残っていると *XL-maf* の強い発現がみられ、いずれも繊維化していた。これらの結果から、眼胞は水晶体の繊維化と *XL-maf* の発現に必要であることが示唆された。一方、free lens における *XmafB* の発現は、*XmafB* が眼胞による水晶体誘導のステップより前の段階で誘導されるということを示唆する。そこで、RT-PCR によって初期神経胚の予定水晶体領域 (presumptive lens ectoderm; PLE) における、*XmafB* の発現を調べた。すると、眼胞が外胚葉に接するより前のステージ18において *XmafB* はすでに PLE に発現していることが明らかになった。また、ステージ14で単離した PLE を単独で培養すると *XmafB* の発現がみられるようになることから、ステージ14の段階で *XmafB* を発現する能力を持っていることが示唆された。そしてこの時期は、Grainger らの移植実験によって得られた lens-forming bias の時期に一致していた。以上の結果より、① *XmafB* は初期神経系胚において誘導され、free lens の形成に関与している、② *XL-maf* は後期神経系胚で眼胞からのシグナルによって誘導され水晶体繊維細胞の分化に関わっている、と考えられる。また、このような *maf* 遺伝子の発現様式は、それぞれの誘導段階における誘導物質探索のためのマーカーとして有効であると思われる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 石橋 祥子

水晶体形成の研究は、1901 年に Spemann がカエルを用いて眼胞除去実験を行い、水晶体形成には眼胞が必須であるという、発生学に初めて「誘導」という概念を導入した時から始まっている。しかし、この水晶体誘導・分化過程における発見「水晶体形成には眼胞が必須である」について、その後の発生生物学的な研究が盛んに行われたにもかかわらず、この現象にどのような遺伝子が関与しているのかという問いについての分子生物学的な研究は大幅に遅れていた。本論文は、モデル生物アフリカツメガエルを用いて、水晶体誘導・分化に関わる転写因子遺伝子をクローニングし、その発現パターンの解析とアフリカツメガエル卵への遺伝子導入実験および組織除去実験を組み合わせ、転写因子 L-Maf と MafB の遺伝子の機能解析を行い、以下の成果を挙げている。

1. アフリカツメガエルの 2 つの *maf* 遺伝子 *XmafB*、*XL-maf* を単離し、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションによって水晶体形成過程における発現パターンを調べ、*XmafB* は予定水晶体領域で、*XL-maf* はやや遅れ、水晶体プラコードで発現し始める。その後両者は水晶体で発現し、*XmafB* は分裂をもつ水晶体上皮細胞で、*XL-maf* は分裂能をもたない水晶体繊維細胞に発現する。
2. 眼胞除去によって生じる *free lens* では、*XmafB* の発現は検出でき、*XL-maf* の発現は誘導されない。*XL-maf* の発現誘導には眼胞が必須である。この結果から、*XmafB* は初期神経系胚において誘導され、*XL-maf* は後期神経系胚で眼胞からのシグナルによって誘導される。
3. *XmafB*、*XL-maf* のアニマルキヤップアッセイでは、水晶体の初期マーカーである β A4、 γ -クリスタリン、*Sox3* の発現が誘導される。*XmafB* では、*Pax6*、*XLens1* の発現が誘導されるが、*XL-maf* では誘導されない。*XmafB* 遺伝子は β A4、 γ -クリスタリンの発現を制御し、*Pax6*、*XLens1* を介して上皮細胞の増殖とその維持に関与している。*XL-maf* 遺伝子は、眼胞からのシグナルによって *Sox3* とともに誘導され、協調して β A4、 γ -クリスタリンの発現を制御、繊維細胞への分化に関わっている。

以上のように、本論文は、水晶体誘導・分化の過程で初めて発現誘導を受ける遺伝子を同定し、水晶体上皮と繊維細胞に特異的に発現する転写因子 L-Maf を MafB を世界で初めて同定し、その機能解析を行ったもので、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。