

所属 (主指導教 官)	動物代謝調節学講座 高橋 直樹 教授		
氏名	島田 直子	提出	平成 15 年 1 月 7 日
題目	水晶体誘導過程におけるクリスタリンの発現制御機構の解析		

要旨

クリスタリンとは、水晶体の 70%以上を占める可溶性タンパク質の総称であり、その水晶体特異的な発現制御機構の解析は、組織特異的な転写調節機構および組織分化への理解を深める上で大変有効な研究対象となる。当研究室では、ニワトリ $\alpha$ A-クリスタリン遺伝子の水晶体特異的な発現制御に働く二つのエンハンサー配列、 $\alpha$ CE1、 $\alpha$ CE2 に結合する転写因子として cCP2 および L-Maf をそれぞれ同定した。bZip 型転写因子、L-Maf は、水晶体プラコードが形成される時期より水晶体系列の細胞に特異的に発現し、クリスタリン等の種々の水晶体分化マーカー遺伝子の発現を誘導する。また、個体における L-Maf の機能阻害実験により、水晶体形成が完全に阻害されることから、L-Maf は水晶体形成において必須であることが明らかとなっている。cCP2 は、様々な遺伝子の組織特異的な発現制御に関わっている CP2 ファミリーに属しており、多くの組織において発現している。培養系において cCP2 は、 $\alpha$ CE1 を介した水晶体細胞特異的な転写活性化を示す。また、L-Maf との互いの結合配列を介した協調的な転写活性化を実現する。

本研究では、水晶体誘導過程において cCP2 および L-Maf がクリスタリンの発現制御、および水晶体発生に果たす役割を解明するため、以下の実験を行った。

1.  $\delta$ -クリスタリンの発現制御における L-Maf の作用機構の解析

個体における L-Maf の水晶体分化能を検討するため、エレクトロポレーション法により、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉の様々な領域に L-Maf を強制発現させた後、種々の水晶体特異的な因子の発現を調べた。その結果、水晶体初期分化マーカーである  $\delta$ -クリスタリンの場合、誘導された領域が水晶体の周囲に限局していた。次に、 $\delta$ -クリスタリンの発現の領域特異性に対する説明として、 $\delta$ -クリスタリンが誘導されない領域ではその発現に必要な何らかの因子が欠如していることが考えられた。そこで、L-Maf とその候補となるいくつかの転写因子の共導入を行ったところ、Sox2 を用いた場合、頭部外胚葉の全域で強い  $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導された。また、 $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現量をも増大させた。さらに、これらは協調して  $\delta$ -クリスタリンエンハンサーを連結したレポーター遺伝子の転写活性化を促進した。以上の結果より、L-Maf と Sox2 は協調して  $\delta$ -クリスタリンの発現、および水晶体発生を制御していることが判明した。

## 2. 水晶体形成、およびクリスタリンの発現制御における cCP2 の機能解析

個体において、培養系でみられた cCP2 と L-Maf による協調的な  $\alpha$ A-クリスタリンエンハンサー ( $\alpha$ 244) のレポーター活性が検出されるかを *in ovo* レポーターアッセイにより検討した。その結果、導入した領域において両者による協調作用が確認された。しかし、cCP2 による  $\alpha$ CE1 もしくは  $\alpha$ CE2 を連結したレポーター遺伝子 ( $\alpha$ CE1x6、 $\alpha$ CE2x6) の転写活性化は、水晶体内でのみ検出されなかった。よって、個体において cCP2 は少なくともエンハンサー上に  $\alpha$ CE1 および  $\alpha$ CE2 の両者が揃うことが正常に機能するために必要であることが示唆された。次に cCP2 が水晶体の初期発生に及ぼす影響を検討するため、cCP2 を個体に導入後、 $\delta$ -クリスタリンの発現、および水晶体の形態を調べた。その結果、L-Maf と共導入した場合、水晶体の陥入の抑制、および水晶体の周囲の頭部外胚葉において異所的な  $\delta$ -クリスタリンの発現の抑制が観察された。さらに、この  $\delta$ -クリスタリンに対する発現抑制は、*in situ* ハイブリダイゼーション法より、 $\delta$ -クリスタリン遺伝子の転写の段階で実現していることが判明した。また、その抑制作用は cCP2 の転写活性化能や DNA 結合能と関連がなかった。以上のことから、個体において cCP2 が機能するには L-Maf の存在が重要であること、水晶体の初期発生に対しては抑制的に作用することが示唆された。

博士論文番号：0081018

水晶体誘導過程における  
クリスタリンの発現制御機構の解析

島田 直子  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 動物代謝調節学講座  
(高橋 直樹 教授)

平成15年1月31日提出

## 目次

第一章 序論	4
1. 発生学-古典生物学から	4
2. 発生学-分子生物学へ	4
3. 発生現象および組織分化の分子モデルとしての眼形成	5
(1). 古典的水晶体研究	5
(2). 遺伝学的なアプローチによる水晶体形成に関わる分子の同定	6
4. 水晶体の発生および機能	7
5. 水晶体発生初期の分子機構	7
6. 本研究の目的	10
第二章 材料と方法	11
1. プラスミド	11
2. RNA プローブ	14
3. ニワトリ胚の培養	15
4. マイクロエレクトロポレーション法による DNA の導入	15
5. 抗クリスタリン抗体の調製	16
6. ホールマウント抗体染色法	16
7. ホールマウント X-gal 染色法	17
8. <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法	17
9. 頭部外胚葉のマッピング	17
10. 凍結切片法	18
11. パラフィン切片法	18
12. 切片抗体染色法	18
13. 大腸菌を用いた融合タンパク質の発現と精製	19
14. 抗体の作製	19
15. ウェスタンブロット法	19
16. ニワトリ網膜細胞の培養	20
17. 培養細胞の抗体染色法	20
18. ルシフェラーゼアッセイ	20
第三章 結果	22
第一節 $\delta$ -クリスタリンの発現制御機構の解析	22
1. L-Maf による種々の水晶体特異的因子の発現誘導	22
2. L-Maf の強制発現による $\delta$ -クリスタリンの発現誘導領域のマッピング	22
3. L-Maf 強制発現後の早い時期における $\delta$ -クリスタリン発現誘導領域の特定	23
4. Sox2 による $\delta$ -クリスタリンの発現領域の拡大	23
5. L-Maf と Sox2 による隆起状構造物の誘導	24
6. 培養細胞における L-Maf と Sox2 の協調作用	24



7. L-Maf による $\delta$ -クリスタリンの発現誘導には Sox2 が必要である	25
8. Sox2 による $\delta$ -クリスタリンの発現時間の短縮	25
9. $\delta$ -クリスタリンエンハンサーを用いた in ovo レポーターアッセイ	26
10. $\delta$ -クリスタリンの発現誘導における L-Maf と Sox2 の物理的相互作用について	27
11. Sox2、Six3、Pax6 各組み合わせが $\delta$ -クリスタリンの発現に及ぼす影響	27
12. L-Maf、Sox2、Pax6、Six3 が互いの発現に及ぼす影響	28
第二節 cCP2 の機能解析	29
1. 個体において cCP2 は L-Maf と協調して $\alpha$ A-クリスタリンの転写を活性化 する	29
2. cCP2 は水晶体において $\alpha$ CE1 を介したレポーター活性を示さない	29
3. cCP2 は L-Maf による $\alpha$ CE2 を介した転写活性化を抑制する	30
4. cCP2 が水晶体形成に与える影響	30
5. cCP2 による $\delta$ -クリスタリンの発現抑制の分子機序	31
6. cCP2 の抑制作用に転写活性化能は関与しない	32
7. cCP2 が水晶体形成に関与する他の転写因子の発現に与える影響の検討	32
8. 個体における cNF2d9 の機能	32
第三節 頭部表皮外胚葉細胞のマッピング	33
第四章 考察	34
第一節 $\delta$ -クリスタリンの発現制御機構について	34
1. 水晶体形成過程における L-Maf と Sox2 の役割	34
2. L-Maf と Sox2 による協調効果	35
3. $\delta$ -クリスタリンの発現制御における L-Maf、Sox2 および Pax6 三者の関係	36
4. $\delta$ -クリスタリンの発現誘導機構は他の水晶体特異的因子とは異なる	37
5. 新規の水晶体形成の分子モデル	38
6. $\delta$ -クリスタリンの発現を制御する他の因子	39
第二節 個体における $\alpha$ CE1 および cCP2 の機能について	40
1. $\alpha$ A-クリスタリンの発現制御における cCP2 の分子機序	40
2. cCP2 による $\delta$ -クリスタリンの発現の抑制機構	41
3. 水晶体分子カスケードにおける cCP2 の位置付け	42
第三節 水晶体の運命決定機構について	43
謝辞	44
引用文献	45

## 第一章 序論

### 1. 発生学-古典生物学から

我々ヒトを含む高等生物はすべて一つの受精卵に由来している。この受精卵は細胞分裂を繰り返した後、形態や役割の異なった多種多様な組織や器官に分化する。この現象は古くから発生学という学問領域の中で多く研究がなされてきた。発生学の創始者、ドイツのシュペーマンは(1938)イモリを用いた移植実験により、初期のう胚期の原口背唇部がそれに接する未分化の外胚葉に働きかけて神経板に分化させることを発見した。このように隣接する未分化な組織を特定の分化に至らしめるよう運命決定作用を誘導と呼ぶ。一方、誘導する組織それ自体をオーガナイザーと呼ぶ。また、この原口背唇部による誘導の後にも、誘導された組織自体が次のオーガナイザーとなることで誘導が連鎖的に引き起こされ、次々に複雑な組織が形成されていくことが明らかにされた。その最も有名な例として水晶体、角膜の誘導がある (Spemann, 1901; Lewis, 1904)。前脳より突出し、将来網膜になる組織、眼胞が隣接した表皮外胚葉に働きかけることで陥入を起こさせて水晶体を誘導し、その水晶体がさらに隣接する表皮外胚葉を角膜に誘導させる。このように、誘導現象は体の基本構造である外中内胚葉の形成、およびそれに伴う軸形成、各組織の形成、いわば発生過程全体を通して重要な役割を担っているといえる。また彼は、原口背唇部を煮沸したり、すりつぶしたり、もしくはアルコールで処理しても誘導活性が失われなかったことから、オーガナイザーの正体は熱に強い物質であると予想していた。

### 2. 発生学-分子生物学へ

発生研究の初期は組織の移植や除去などといった実験的手法を用いた解析が主流であった。時代は進み、分子レベルで生命現象を解明しようという試みが盛んになった。

細胞が分裂する際、DNA も同時に複製される。つまり、どの細胞も同一のゲノムを有していることを意味する。では、各細胞は何をもって異なる運命に向かうのか、というのが発生現象の分子機構を解明する際に生じるの最も根本的な問いであろう。

この答えは遺伝子の発現調節にある。ある組織において必要な遺伝子の発現は促進され、不必要な遺伝子は常に発現が抑制される状態におかれている。遺伝子は蛋白質の設計図であり、各組織で必要な蛋白質を必要な時に必要な量を発現させることが組織分化における遺伝子発現の最終地点である。遺伝子の発現制御はクロマチンレベルにおける DNA の構造変化に始まり、遺伝子を鋳型である mRNA の形としてコピーする転写調節、mRNA のスプライシングから安定性や分解までを行う転写後調節、mRNA の情報を元に蛋白質を合成する翻訳制御、生成されたタンパク質の折りたたみ、切断、修飾により機能タンパク質たらしめたり、その安定性を制御する翻訳後制御といった様々な段階で行われている。

前述した熱に強いオーガナイザーの正体は分泌シグナル因子であることが近年明らかにされつつある (Harland and Gerhart, 1997)。この分泌シグナル因子自身もまた特定

の遺伝子によってコードされており、その因子が標的とする特定の組織においてその組織の決定に働く下流遺伝子（多くは転写因子をコード）の発現を誘導する。以降の転写因子を主軸とする転写調節機構は遺伝子から情報を読み取る最初の段階であり、ある特定の転写因子の組み合わせが特定のより下流の遺伝子（転写因子や機能タンパク質、構造タンパク質をコード）の発現を誘導する。発生および組織特異的な多くの遺伝子の発現制御機構は転写因子の解析を通じて明らかにされてきた。

その代表例として、Hox 遺伝子群がある。ホメオドメインをもつ転写因子であり、昆虫からヒトまで高く保存されている (Acampora et al., 1989)。各 Hox 遺伝子の染色体上の位置と実際に発現する部位に相関があり (McGinnis and Krumlauf, 1992)、これらの遺伝子と下流遺伝子の発現パターンが組合わさることで、体の区画が厳密に決定されている。ヘッケルの「個体発生は系統発生を繰り返す」という有名な説があるが、Hox はこのことを分子レベルで証明する一例であるといえよう。

また、組織特異的な分化に働く転写因子として有名なのが、bHLH スーパーファミリーに属す MyoD ファミリー筋形成タンパク群である。MyoD は様々な細胞を筋前駆細胞に転換させることが可能であり、骨格筋のマスター遺伝子と呼ばれている。各分化段階はパートナーの HLH により複雑に制御されている (Weintraub, 1993)。

組織特異的な遺伝子発現制御機構をより明らかにしていく手段の一つとして、その組織の形成に関わる遺伝子の同定が必要である。今日では、ゲノム上の配列にランダムに変異を導入して個体に戻す、リバーシジェネティックスの手法を用いることにより、目的の遺伝子を探索することが可能になっている。また近年、世界規模のゲノムプロジェクトの遂行により、ヒトにとどまらず、様々な実験動物の全ゲノムが解読されつつある。このことが、新規遺伝子の発見やその機能解析に拍車をかけ、今後、発生現象の全容の解明にますます近付いていくと期待される。

### 3. 発生現象および組織分化の分子モデルとしての眼形成

眼は、構造が単純であるという形態的特徴のほか、その形成過程において、誘導、増殖、分化などといった発生の基本現象の観察が可能である。また、培養系における実験が容易であることから、眼形成は、細胞および分子レベルで発生現象を解明するモデル系として大きく貢献してきた。

#### (1). 古典的水晶体研究

シュペーマンによる水晶体の誘導現象の発見以来 (1901)、様々な生物を用いて様々な移植実験が行われてきた。当時は、水晶体の誘導には眼胞はどの程度重要であり、それにはどの時期にどのような条件が必要であるのかを解明することが大きな焦点の一つであった。眼胞の移植実験から、高等生物ほど水晶体の誘導において眼胞の存在が重要であること、誘導能を持つ時期が厳密に決定されていることが明らかにされてきた。一方、誘導シグナルの受け手側である頭部表皮外胚葉が水晶体に分化する能力 (コンピテンス) を獲得する機構もまた研究されてきた。コンピテンスとは、外胚葉が備えた、誘導シグナルに応答するための積極的な機構である (Servetnick and Grainger,

1991)。Grainger はカエルの胚を用いた移植実験により、原腸胚中期に予定網膜領域とそれを裏打ちする内胚葉からのシグナルによって外胚葉の比較的広範な領域に水晶体コンピテンスが形成されることを確認している (Grainger, 1992)。

また、今日の分子生物学的手法により、初めて明らかになったと思われる種々の事実、例えば、眼胞からの化学物質 (モルフォゲン) の濃度差が水晶体の分化を支配すること、およびそれには閾値が存在することなどが、すでに移植実験により推測されていた (Polezajev, L. V., 1936; Popow and Nikitenko, 1937)。これは驚愕に値する。古人の観察眼の鋭さには目を見張るものがあり、古典発生学と比較した現在の水晶体研究の進歩は僅かであるという感を否めない。

## (2). 遺伝学的なアプローチによる水晶体形成に関わる分子の同定

水晶体の誘導および分化に関わる遺伝子もまた研究されてきた。水晶体形成過程を明らかにする上で、水晶体特異的なクリスタリン遺伝子の発現機構の解析 (下流からのアプローチ) が重要な役割を果たしている。クリスタリンとは、水晶体の 70%以上を占める可溶性タンパク質の総称である (Piatigorsky, 1981, 1989)。分子量が大きく水晶体分化のマーカーとなっている。脊椎動物においては少なくとも 5 億年前から存在し、水晶体の構造および透明性の維持に関わっているとされる。クリスタリンの修飾、構造変化、凝集および分解が白内障の原因の一つとなっている。

クリスタリンは抗原性の違いにより、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  の 4 種類に分類されている (Piatigorsky, 1981)。 $\alpha$ A-クリスタリン遺伝子は分子シャペロンの代表タンパク質である HSP 遺伝子に由来すると考えられており、自身も他のクリスタリンに対する分子シャペロンとして機能することが報告されている (Horwitz, 1993; Nicholl and Quinlan, 1994)。 $\alpha$ A と  $\alpha$ B の二つのサブクラスよりなり、前者は水晶体特異的、後者は神経組織や腎臓などの様々な組織で発現している。 $\beta$ -クリスタリンは、 $\beta$ A、 $\beta$ B とに分類され、カルシウム結合性タンパク質と相同性が高い (Wistow, 1995)。水晶体繊維特異的な発現を呈する。 $\delta$ -クリスタリン遺伝子は鳥類とは虫類のみに存在しており、アルギニノコハク酸リアーゼ遺伝子に由来すると考えられている (van den et al., 1996)。発現は水晶体特異的で水晶体誘導の初期より検出されることから、水晶体分化の初期マーカーとなっている。 $\gamma$ -クリスタリン遺伝子は  $\delta$ -クリスタリン遺伝子を持たない種において存在している。 $\beta$ -クリスタリンより由来することが考えられており、水晶体繊維に特異的に発現する。これまでに行われてきたクリスタリン遺伝子の上流解析から、クリスタリンの発現の誘導に関与していると考えられる転写因子が複数見つかっており (後述)、これらが水晶体形成の遺伝子カスケードの解明の手がかりになると期待される。

一方、水晶体の細胞骨格タンパク質の存在は 40 年近く前から知られており、主に水晶体の構造の維持に関わっている。その構成因子として、チューブリン、アクチン、ビメンチン、スペクトリン、フィレンシン (CP95)、フィレンシンライク (CP49) などが知られている。これらとクリスタリンとの相互作用は、水晶体細胞の透明性の維持にも重要である。中でも、水晶体特異的な中間系フィラメントであるフィレンシン、

CP49 は、水晶体が自動的に焦点を合わせる時の物理的ストレスに対する抵抗力（弾力）として機能しており、水晶体がその特質を呈する上で重要である (Quinlan et al., 1999)。これらは  $\alpha$ A-クリスタリンと beaded filament と呼ばれる形態的に極めて特徴的な複合体を形成する。マウスフィレンシン遺伝子上流には、転写因子 L-Maf や Sox2 の結合配列が存在することが報告されており (Masaki et al., 1998)、その上流解析が水晶体特異的な形態変化を制御する機構の解明に繋がると期待される。

#### 4. 水晶体の発生および機能

眼の構成要素の一つである水晶体は、カメラでいう絞りとしての機能を担う。自らの厚みを変えることで、視覚情報である光の屈折率を調節して網膜上に結ばれる像の焦点を合わせている (図 1A)。水晶体の発生過程は他の組織と比較して極めて特徴的である。孵卵開始後 30 時間ほど (ステージ 9) 経つと、前脳の左右から突起が形成され、側方へ伸展を開始する。45 時間ほどになると (ステージ 11)、前脳由来の突起は眼胞となり、頭部表皮外胚葉に隣接するようになる。この隣接した眼胞に裏打ちされた表皮外胚葉の領域は次第に肥厚し、将来水晶体細胞となる水晶体プラコードを形成する。約 48 時間後 (ステージ 12)、水晶体分化初期マーカーである  $\delta$ -クリスタリンの発現が、水晶体プラコードにおいて検出できるようになる。孵卵開始から約 52 時間後 (ステージ 13)、水晶体プラコードは眼胞からの誘導により、内側へ陥入し始める。水晶体プラコードの陥入と同時に眼胞の外側の層 (将来神経性網膜を形成する部分) が内側に陥没する。孵卵開始から約 56~64 時間の間 (ステージ 17) 陥入の進んだ水晶体プラコードはくびり切れて水晶体胞を形成する (図 1B)。水晶体胞に接した外側の頭部表皮外胚葉は、水晶体胞からの働きかけにより角膜に分化する。(約 56~64 時間後)。また、この時期より水晶体胞において  $\alpha$ A-クリスタリンの発現が検出されるようになる。孵卵開始後約 73~80 時間後 (ステージ 20) になると水晶体の基本構造が完成する。

水晶体胞の前方を構成する細胞はいわば水晶体工場であり、分裂を一生涯繰返すことになる。前方に由来する増殖した細胞群は後方へと順に移動するが、水晶体の赤道部に達すると繊維化が開始され、細胞の伸展、さかんな蛋白質合成を伴って先に繊維化した細胞を包み込んでいく。繊維化の終了した細胞は脱核、脱水、細胞内小器官の分解、およびクリスタリン蛋白質の秩序だった重合化を促進し、光の透過性を保った水晶体構造の一角を形成する。

#### 5. 水晶体発生初期の分子機構

水晶体形成への関与が明らかになっている因子として、水晶体の誘導からクリスタリン遺伝子の発現に至るまでに機能しているものがいくつか同定されている。以下に、これら因子の性質および機能について概説する。

眼胞からの誘導シグナルの候補として、分泌タンパク質である FGFs (Fibroblast growth factor) および BMPs (bone morphogenetic protein) がある。FGF シグナリングは水晶体繊維細胞の分化のみならず、水晶体誘導にも関与していることが最近、ドミナン

トネガティブ型の FGF レセプター遺伝子を Pax6 上皮エンハンサーに連結したトランスジェニックマウスの解析により明らかにされている (Faber et al., 2001)。一方、リガンドである FGF のうち、FGF8 (Lovicu and Overbeek, 1998; Vogel-Hopker et al., 2000) および FGF15 (McWhirter et al., 1997) は水晶体誘導過程において機能すると考えられている。

TGF- $\beta$ ファミリーに属す BMP のうち、BMP7 は、Pax6 の上流で機能し、水晶体プラコードの形成やその後の分化に必須であることが判明している (Wawersik et al., 1999)。一方、BMP4 も同様に水晶体プラコードの形成に必須であるが、Pax6 の発現の制御には関与していない (Furuta and Hogan, 1998)。このことから、BMP4 は BMP7 とは独立した別のカスケード上の他の因子と協調することで水晶体の誘導を実現していることが示唆されている (Wawersik et al., 1999)。

Pax6 は、ホメオドメインをもつペアータイプ転写因子であり、ヒトの疾患である無虹彩症 (aniridia)、およびマウスで見つかった Small eye 変異の原因遺伝子として同定されたものである (Hill et al., 1991; Ton et al., 1991)。ショウジョウバエやゼノパスにおいて Pax6 を強制発現させることにより、眼を異所的に誘導することができる (Halder et al., 1995; Chow et al., 1999; Czerny et al., 1999)。頭部外胚葉における Pax6 の発現は、水晶体分化コンピテンスを形成するのに必須である (Fujiwara et al., 1994; Quinn et al., 1996; Collinson et al., 2000; Reza et al., 2002)。これらの特徴から Pax6 は、眼形成のマスターレギュレーターであると考えられている (Quiring et al., 1994; Halder et al., 1995)。Pax6 はまた、*L-maf*、*Prox1* やクリスタリンなどの水晶体特異的な遺伝子の転写活性化にも機能している (Cvekl and Piatigorsky, 1996; Reza et al., 2002)。

Six3 はホメオボックスを持つ転写因子であり、ショウジョウバエの初期の眼形成に必須である *sine oculis* (so) のホモログとして同定されたものである (Cheyette et al., 1994; Oliver et al., 1995)。マウス Six3 をメダカの眼胞に強制発現させることで、水晶体を異所的に誘導することができる (Oliver et al., 1996)。最近、Six3 はコリプレッサーである *Groucho* と協調することで眼形成と  $\delta$ -クリスタリンの発現に対して抑制的に作用することが明らかにされている (Kobayashi et al., 2001; Zhu et al., 2002)。

ショウジョウバエの眼形成のカスケード上で機能する Pax6/eyeless や Six3/*sine oculis* などのいくつかの因子が脊椎動物においても保存されていることから、眼の発生過程を制御するカスケード全体が、無脊椎動物から脊椎動物まで高く保存されていることがうかがえる (図 2) (O'Neill et al., 1994; Chow and Lang, 2001; Kumar and Moses, 2001)、(図 3) (Jean et al., 1998; Chow and Lang, 2001)。しかし一方で、脊椎動物のカスケードの中には独自に進化した部分もまた存在する。

Sry 関連遺伝子に分類される Sox ファミリーは転写活性化ドメインと高度に保存された DNA 結合ドメイン、HMG を持つ転写因子であり、脊椎動物の水晶体形成に関与している (Laudet et al., 1993; Kamachi et al., 1995)。Sox は、標的遺伝子を転写活性化する際にパートナー因子を必要とする (Kamachi et al., 2000)。Sox のうち、水晶体形成に働くのは Sox1、2 および 3 である (Kamachi et al., 1998; Nishiguchi et al., 1998)。ニワトリの場合において、Sox2 と Pax6 を強制発現させると、異所的な水晶体プラコ

ード、ならびに L-Maf や  $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導する (Kamachi et al., 2001; Reza et al., 2002)。 $\delta$ -クリスタリンの発現における両者の協調作用は、 $\delta$ -クリスタリンの第三イントロン上の水晶体特異的なエンハンサー配列 DC5 を介することで実現されている (Kamachi et al., 2001)。これらの報告より Sox2 は、水晶体の誘導、および分化段階の両者に関与しているといえる。

一方、当研究室ではニワトリのクリスタリン遺伝子群の一つである  $\alpha$ A-クリスタリン遺伝子上流にある2つのエンハンサー配列  $\alpha$ CE1、 $\alpha$ CE2 に結合する因子として cCP2 および L-Maf をそれぞれ同定した (図 4A) (Murata et al., 1998; Ogino and Yasuda, 1998)。

CP2 ファミリーは発生過程や細胞レベルで機能する様々な遺伝子の発現制御に関与していることが知られている。例えば T 細胞の増殖、グロビン遺伝子の発現、ステロイドの合成などに機能している (Jane et al., 1995; Sueyoshi et al., 1995; Volker et al., 1997; Zhou et al., 2000)。また、CP2 は Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) と複合体を形成するアダプタータンパク質 Fe65 と直接相互作用することで、細胞周期の G<sub>1</sub> から S 期への進行を阻害する (Bruni et al., 2002)。最近、ショウジョウバエにおいて dCP2 が同定されたことから (Wilanowski et al., 2002)、CP2 が無脊椎動物からヒトまで高く保存されていることが伺える。ニワトリ cCP2 は、マウス赤血球特異的に発現する  $\alpha$ -グロビン遺伝子のプロモーターに結合する転写因子 CP2 (Lim et al., 1992) と高い相同性をもつ (図 4B) (Murata et al., 1998)。cCP2 の発現はユビキタスであるが (図 4C)、培養系での実験により、 $\alpha$ CE1 を介した水晶体細胞特異的なレポーター遺伝子の転写活性化を実現することが確認されていた。また、この時 cCP2 結合配列に隣接した LSE (Lens Specific Element) が cCP2 による水晶体特異的な転写活性化に必要であることが明らかにされている (Murata et al., 1998)。

L-Maf (Lens-Maf) は、bZIP 型ドメインを持つ Maf ファミリーに属する転写因子である (図 4B)。Maf ファミリーの水晶体形成への関与は近年より報告が相次いでいるが (Sakai et al., 1997; Moens et al., 1998; Ogino and Yasuda, 1998; Kawachi et al., 1999; Kim et al., 1999; Ishibashi and Yasuda, 2001; Kajihara et al., 2001; Yoshida and Yasuda, 2002; Reza et al., 2002; Ochi et al., 2003)、L-Maf のみはその発現に水晶体特異性を示す (図 4D, E)。L-Maf は水晶体プラコード形成の時期より発現し、クリスタリン等の種々の水晶体分化マーカー遺伝子の転写を活性化する。また、強制発現によりニワトリ網膜細胞を水晶体細胞に分化転換することが報告されている (Ogino and Yasuda, 1998)。個体において L-Maf は Pax6 の下流で機能していることが明らかになっている (Reza et al., 2002)。L-Maf を個体の腹側頭部外胚葉に強制発現させると、 $\delta$ -クリスタリン、およびホメオボックス遺伝子であり、水晶体繊維細胞の最終分化に関与する Prox1 (Wigle et al., 1999) の発現を誘導する (Ogino and Yasuda, 1998; Reza et al., 2002)。一方、ドミナントネガティブ型 L-Maf を導入した胚は、水晶体が欠失しており、 $\delta$ -クリスタリンや Prox1 の発現も観察されない (Reza et al., 2002)。これらの知見より、L-Maf は水晶体形成、および  $\delta$ -クリスタリンの発現において重要な役割を果たしていることが示唆される。しかしながら、L-Maf が  $\delta$ -クリスタリンの発現を制御する分子機構は未

だ明らかにされていない。

## 6. 本研究の目的

本研究では、水晶体誘導過程における

- (1).  $\delta$ -クリスタリンの発現制御における L-Maf の作用機構の解析
- (2). 水晶体形成、およびクリスタリンの発現制御における cCP2 の機能解析  
を調べるために、水晶体プラコードが形成される時期のニワトリ胚に対し、エレクトロポレーション法を用いてこれらの遺伝子、および各因子の結合配列を連結したレポーター遺伝子を導入した。また、水晶体プラコード形成期以降の頭部外胚葉において、将来水晶体を形成する細胞を同定するために、
- (3). DiI 標識による頭部外胚葉の運命予定図の作成  
を実施した。これらの実験により、以下のことを明らかにした。
  - (1). L-Maf による  $\delta$ -クリスタリンの発現誘導には Sox2 を必要とし、両者は  $\delta$ -クリスタリンエンハンサーを介して協調することで  $\delta$ -クリスタリン遺伝子の転写を活性化する。
  - (2). cCP2 の機能の発揮には L-Maf の存在が重要であり、おそらくは水晶体の初期発生を抑制することで後期分化を促進している。
  - (3). 水晶体は水晶体プラコードのみならず、より腹側の頭部外胚葉の細胞によっても構成されている。



## 第二章 材料方法

### 1. プラスミド

#### pCAGGS-GFP

発現ベクター pCAGGS のマルチクローニングサイトにある 2 つの *EcoRI* サイトに *EcoRI* で消化した GFP の cDNA 断片挿入したものである (Ogawa et al., 1995)。

#### pCAGGS-FG-L-Maf

発現ベクター pCAGGS のマルチクローニングサイトにある *EcoRI*、*BglIII* サイトに pEFX3-FG-L-Maf プラスミドから *EcoRI*、*BamHI* により切り出した FG-L-maf cDNA (1027bp) の断片を挿入したものである (Ogino and Yasuda., 1998)。

各変異型 L-Maf、pEFX3-fg-L(92-132)-bZip、-VP16-LbZip、-LAH は当研究室卒業生 吉田 智則 博士により作成されたものである。

#### pCASFL-cSox2

Sox2 の ORF を *PstI* サイトで二分した各断片は 10 日目水晶体 RNA を鋳型に RT-PCR 法により増幅した。前半は *HindIII*、*PstI* で消化し、pBlueScript Sk+ の *HindIII*、*PstI* 断片とライゲーションした。後半はそのまま TA vector に挿入した。pBlueScript Sk+ Sox2 前半を *PstI*、*BamHI* で消化し、*PstI*、*BamHI* で消化した後半とライゲーションした。続いて、pBlueScript Sk+ Sox2 から *HindIII*、*BamHI* で消化することにより全長 Sox2 を切り出し、これを pCASFL 発現ベクターの *HindIII*、*BglIII* サイトに挿入した。PCR 法に用いたプライマーを以下に記す。

#### Sox2 前半

5'-プライマー 5'-GTCAAGCTTATGTACAACATGATGGAAACCG-3'

*HindIII*

3'-プライマー 5'-TTGAGGTAAGTGGTCGAGC-3'

#### Sox2 後半

5'-プライマー 5'-CATGCACCGCTACGACG-3'

3'-プライマー 5'-GGGAGATAGTGTATACACTTCTGCCTAGGTCT-3'

*BamHI*

#### pEFX3FLAG-VP16-Pax6

発現ベクター pEFX3FLAG (Ogino and Yasuda, 1998) のマルチクローニングサイトにある *BamHI* サイトに PCR 法により増幅し、*BamHI* で消化した Pax6A cDNA 断片を挿入したものである (Reza et al., 2002)。

#### pCMXGLO-ATF4

発現ベクター pCMXGLO のマルチクローニングサイトにある *KpnI*, *NheI* サイトに PCR 法により増幅し、*KpnI*, *XbaI* で消化した ATF4 cDNA 断片を挿入したものである (Murata et al., 1998)。

#### pcDNA-cProx1

発現ベクター pcDNA (Invitrogen) のマルチクローニングサイトにある *NotI* サイトに Tomarev 博士により分与された Prox1 cDNA 断片 (Tomarev et al., 1996) を挿入したものである (Reza et al., 2002)。

#### pCASFL-cSix3

Six3 の ORF を Asp718 サイトで二分した各断片は 10 日目水晶体 RNA を鋳型に RT-PCR 法により増幅した。前半の *HindIII* と Asp718 断片を pBlueScript Sk+ の *HindIII*, Asp718 断片とライゲーションした。後半は TA vector に挿入した。TA vector-Six3 後半を *HindIII*, Asp718 で消化し、これと前半の *HindIII*, Asp718 断片とライゲーションした。続いて、TA vector-Six3 から *HindIII*, *BamHI* で消化することにより全長 Six3 を切り出し、これを pCASFL 発現ベクターの *HindIII*, *BglIII* サイトに挿入した。以下に PCR 法に用いたプライマーを記す。

##### Six3 前半

5'-プライマー 5'-TGTAAGCTTGTTCATCCCATGGTGTTCAGG-3'

*HindIII*

3'-プライマー 5'-CCTCACCATGGACGTCCTGG-3'

*Asp718*

##### Six3 後半

5'-プライマー 5'-CAAGGAGAGGACTCGCAGC-3'

3'-プライマー 5'-GCTGAGCCT-TACTACTACTCCTAGGTCA-3'

*BamHI*

#### pET16b-Sox2

Sox2 の全 ORF を pBlueScript Sk+ cSox2 を鋳型に PCR 法により増幅し、その後 *BamHI* で消化した後、*Klenow* 酵素で平滑末端化した。ベクター PET16b は *NdeI* で消化した後、*Klenow* 酵素で平滑末端化した。その後、これらのインサートとベクターをライゲーションした。PCR 法に用いた 5'-プライマーは pCASFL-cSox2 で用いた前半 5'-プライマーの *HindIII* サイトを *BamHI* サイトに置換したものである。3'-プライマーは pCASFL-cSox2 で用いた後半 3'-プライマーと同様のものを用いた。

5'-プライマー 5'-GTCGGATCCATGTACAACATGATGGAAACCG-3'

*BamHI*

#### pCASFL- ΔDBD Sox2

Sox2 の前半の HMG ドメインを欠いたフラグメントを pBlueScript Sk+cSox2 を鋳型に PCR 法により増幅し、その後 *HindIII*、*BamHI* で消化したものを pCASFL の *HindIII*、*BglIII* 断片に挿入した。その後、PCR 法に用いたプライマーを以下に記す。なお、3'-プライマーは pCASFL- Sox2 の後半用のものを用いた。

5'-プライマー 5'-CACAAAGCTTACCAAGACCCTGATGAAGAAGG-3'

*HindIII*

#### pCMXGLO-En-cCP2

En 断片は Tlx-En を鋳型に PCR 法により増幅した。これを *SplII*、*Asp718* で消化した後、pCMXGLO-cCP2 (Murata et al., 1998) を *Asp718* で消化した断片とライゲーションした。PCR 法に用いたプライマー (本研究室助手 荻野 肇 博士 作製) を以下に記す。

5'-プライマー 5'-GAACCGTACGATGGCCCTGGAGGATCGCT-3'

3'-プライマー 5'-AGGTCTCTTTAGACGAGACCCATGGCTAG-3'

#### pGV3tkβ-gal-BHd fragment (the third intron of *δ-crystallin* gene)

δ-クリスタリン第3イントロン全長はニワトリ三日目胚ゲノムライブラリー (本研究室卒業生 百瀬 剛 博士作製) を鋳型に RT-PCR 法により増幅し、TA vector に挿入した。次に、*HindIII*、*BamHI* による消化により δ-クリスタリン第3イントロンのサブフラグメント (BHd) 断片を得、さらに *Klenow* 酵素により平滑末端化した。一方、pGV3tkβ-gal (本研究室卒業生 山口 泰華さん作製) は *SmaI* により消化した。これら BHd と pGV3tkβ-gal ベクターをライゲーションした。以下に PCR 法に用いたプライマーを記す。

5'-プライマー 5'-ATGTGATATCCAGGCAAGCATGG-3'

*EcoRV*

3'-プライマー 5'-CGGTAACTTGCGTCTGACTTCGAAGAG-3'

*HindIII*

#### pGV3tkβ-gal-HNX6

本研究室卒業生 吉田 智則 博士により分与された *BamHI*、*BglIII* で消化済みの HN (HindIII-NcoI fragment of the third intron of *δ-crystallin*) X6 断片を *BamHI* で消化した pGV3tkβ-gal 断片に挿入した。

#### pGV3tkβ-gal-mSoxUD、-mMafUD、-ΔBN fragment of the third intron of *δ-crystallin* gene)

大阪大学 生命機能研究科 近藤 寿人教授により贈与された各 pBlue Script KS<sup>+</sup>

mSoxUD、-mMafUD、- $\Delta$ BN を *EcoRV* による消化により  $\delta$ -クリスタリン第3イントロンの各サブフラグメントの断片を得た。一方、pGV3tk $\beta$ -gal (本研究室卒業生 山口 泰華さん作製) は *SmaI* により消化した。各サブフラグメント断片と pGV3tk $\beta$ -gal ベクターをライゲーションした。

p $\alpha$ CE1 $\times$ 6  $\beta$  $\beta$ -gal (p $\alpha$ CE1 $\times$ 6  $\beta$ Luc, p mt  $\alpha$ CE1 $\times$ 6  $\beta$ Luc)

pBluescriptSK のマルチクローニングサイト中の *BamHI* サイトにニワトリ $\alpha$ A-クリスタリンの  $\alpha$ CE1 配列 (-162~-134) を6つ連結したもの、および *SphI* サイトに $\beta$ -actin basal promoter (-55~+53) を挿入したものである(熊本大学 医学部 助教授 松尾 勲 博士より分与)。

p $\alpha$ CE2 $\times$ 6  $\beta$  $\beta$ -gal

作製方法は p $\alpha$ CE1 $\times$ 6  $\beta$  $\beta$ -gal と全く同様であり、 $\alpha$ CE1 配列を  $\alpha$ CE2 (-119 ~ -99) 配列に置き換えたものである(熊本大学 医学部 助教授 松尾 勲 博士より分与)。

## 2. RNA プローブ

### $\delta$ -クリスタリンに対する RNA プローブ

$\delta$ -クリスタリン cDNA (142 ~1398 bp) が挿入されたプラスミド (SK+ $\delta$ -cry、当研究室卒業生 鈴木 仁 博士より分与) を *Bam HI* によって切断後、T7 ポリメラーゼを用いて転写した産物を使用した。

### Pax6 に対する RNA プローブ

当研究室 卒業生 小野 浩一郎 さんより分与された Pax6 cDNA (1 ~459 bp) を挿入したプラスミド (pSP73/cPax6 2-6) 及び、cDNA (483~1801 bp) を挿入したプラスミド (pSP73/cPax6 3-4 当研究室卒業生 鈴木 仁 博士より分与) を *BglIII* によって切断後、T7 ポリメラーゼを用いて転写した産物を使用した。

### cSix3 に対する RNA プローブ

cSix3 cDNA (473 ~1185 bp) が挿入されたプラスミド (SK(-)-cSix3、東京大学 助教授 嶋村 健児 博士より分与) を *HindIII* によって切断後、T3 ポリメラーゼを用いて転写した産物を使用した。

### cSox2 に対する RNA プローブ

cSox2 の一部 551 bp が挿入されたプラスミド (SK+/cSox2、大阪大学 内川 昌則 博士より分与) を *SalI* によって切断後、T7 ポリメラーゼを用いて転写した産物を使用した。

### L-Maf に対する RNA プローブ

本研究室元助手 荻野 肇 博士より分与された L-maf cDNA (1108~1737bp) を挿入

したプラスミド (pBloescript SK-/L-maf/9f1-6) 及び、cDNA (209~1098 bp) を挿入したプラスミド (pBloescript SK-/L-maf/4f1-7) をそれぞれ *Xba*I、*Asp*718 で消化後、T7、および T3 ポリメラーゼを用いて転写し、その産物を使用した (Ogino and Yasuda, 1998)。

#### αA-クリスタリンに対する RNA プローブ

αA-crystallin cDNA (0.6Kb) が挿入されたプラスミド (pSP73-αA-cry; 本研究室助手 荻野 肇 博士より分与) を *Bam*HI により切断後、T7 ポリメラーゼを用いて転写し、その産物を使用した。

#### CP95 (filensin) に対する RNA プローブ

CP95 cDNA (2.5Kb) が挿入されたプラスミド (pBluescript SK(-)/CP95; Ozawa. K 博士より分与) を *Bam*HI により切断後、T7 ポリメラーゼを用いて転写し、その産物を使用した。

#### CP49 (filensin like) に対する RNA プローブ

CP49 cDNA が挿入されたプラスミド (pBluescript SK(-)/CP49-22; Ozawa. K 博士より分与) を *Bam*HI により切断後、T7 ポリメラーゼを用いて転写し、その産物を使用した。

### 3. ニワトリ胚の培養

竹内孵卵場 (奈良県) および城山鶏園 (神奈川県) から購入した受精卵を 38℃、湿度 100% に設定したインキュベーター内に静置し、発生を進行させた。なお、発生ステージの決定は Hamburger and Hamilton (1951) に従った。

### 4. マイクロエレクトロポレーション法による DNA の導入

基本的には百瀬氏の方法に従った (Momose et al., 1999)(綾-村田友子ら, 1999)。孵卵後約 35 時間 (ステージ 9~11) の卵から注射器を用いて卵白を 5cc を除き、ハサミで上側の殻に穴を開けた。DNA 溶液 (導入したいプラスミドに対して 1/10 量の pCAGGS-GFP および 1/20 量の 1%Fast Green を混合したもの) を導入したい組織の周囲に注入した後、二本のタングステン電極を導入したい組織を挟み込むように固定し、12V、50msec、5pulse の条件で遺伝子を導入した。導入後、セロテープで殻の穴を閉じ、インキュベーターでさらに目的の時間まで発生を進行させた。なお、導入した DNA の種類およびその濃度は以下に列挙した。

pCAGGS-L-maf (2μg/μl)

PCASFL-cSox2 (2μg/μl)

pCAGGS-L-maf (2μg/μl):PCASFL-cSox2 (2μg/μl)

pEFX3FLAG-VP16-Pax6 (4μg/μl)

pCAGGS-L-maf (2 $\mu$ g/ $\mu$ l): pEFX3FLAG-VP16-Pax6 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 pCASFL-cSix3 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 pCAGGS-L-maf (2 $\mu$ g/ $\mu$ l):pCASFL-cSix3 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 pCASFL-cSox2 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l): pEFX3FLAG-VP16-Pax6 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 pCASFL-cSox2 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l):pCASFL-cSix3 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 pCAGGS-L-maf (2 $\mu$ g/ $\mu$ l): pEFX3FLAG-VP16-Pax6 (4 $\mu$ g/ $\mu$ l):PCASFL-cSox2 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 pGV3tk $\beta$ -gal-BHd (1.4 $\mu$ g/ $\mu$ l): pCAGGS (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 pGV3tk $\beta$ -gal-BHd (1.4 $\mu$ g/ $\mu$ l): 各発現プラスミド (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l): pCAGGS (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 pGV3tk $\beta$ -gal-BHd (1.4 $\mu$ g/ $\mu$ l)各発現プラスミド 1 (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l):各発現プラスミド 2  
 (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 pGV3tk $\beta$ -gal-HNX6 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l): pCAGGS (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 pGV3tk $\beta$ -gal-HNX6 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l):各発現プラスミド(0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l): pCAGGS (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 pGV3tk $\beta$ -gal-HNX6 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l):各発現プラスミド 1 (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l):各発現プラスミド 2  
 (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 各  $\alpha$ A-クリスタリンエンハンサープラスミド(5 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 各  $\alpha$ A-クリスタリンエンハンサープラスミド(4.4 $\mu$ g/ $\mu$ l):各発現プラスミド(0.6 $\mu$ g/ $\mu$ l)

## 5. 抗クリスタリン抗体の調製

$\delta$  および  $\alpha$ A-クリスタリンに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ (熊本大学 江口 吾朗 氏より分与(Sawada et al., 1993)) をハイブリドーマ用培地 (10 % FBS, 2.5 g /L Glucose, 1.9 g /L NaHCO<sub>2</sub>, 50000 U/ L Penicillin, 50 mg/ L Streptomycin / Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)) を用いて5倍希釈で4、5回継代培養した。上清を回収後、ドットプロット法により抗体の産生量を確認した。実際のホールマウント抗体染色法で用いる抗体の希釈倍率は抗体濃度を変化させて予備実験を行うことにより決定した。

## 6. ホールマウント抗体染色法

綾村田 友子さん (1997 年度 綾 奈良先端大 修士論文) によるプロトコルに従った。取り出した胚を Hanks' (CMF+1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>) で洗浄し、4 %PFA/Hanks' 中、4 $^{\circ}$ C で一晩固定した。GFP 陽性シグナルを撮影後、MeOH 中に2~3 時間、-20 $^{\circ}$ C で静置した。氷上で MeOH/DMSO (1:1) 中に胚が沈むまで (約 30 分) 置いた後、1/4 量の 10 % Triton X-100/DW を加えて 30 分間静かに振とうした。1 % Periodic acid / DW 中で約 15 分間振とうさせた後、10% Ramb serum/ Hanks'-T (Hanks'+0.1% Triton X-100) 中で室温で一晩振とうした (ブロッキング)。2% BSA/Hanks'-T を用いて 20 倍に希釈した 1 次抗体中で一昼夜、室温で振とうした。抗体処理後、Hanks'-T で 6 ~ 8 時間洗浄した (バッファー交換 3 回)。続く 2 次抗体 (anti-mouse Ig Ab. From sheep (HRP); アマシャム) 処理および洗浄も 1 次抗処理と同様の方法で行った。0.25 mg/ml DAB/TS 中で 1 時間室温でプレインキュベートした。氷上で胚が沈むまで (約 1 時間) 静置した後、0.125 mg/ml DAB/TS 中で 0.012 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えて発色させた。

## 7. ホールマウント X-gal 染色法

取り出した胚を PBS (7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.13m NaCl, PH 7.4) 中で洗浄し、PBS sol'nI (0.2 % Glutaraldehyde, 0.4 % Paraformaldehyde, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 0.02 % Sodium deoxycholate, 0.02 % NP-40 /PBS)中で 4℃で一晩固定した。GFP 陽性シグナルを撮影後、PBS sol'nII (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01 % Sodium deoxycholate, 0.02 % NP-40 /PBS)で 15 分間、2 回氷上でリンス、つづいて、室温で 15 分間振とうした。ハイブリオープンを用いて staining sol'n (20 mM K-ferricyanide, 20 mM K-ferrocyanide, 0.01 % Sodium deoxycholate, 0.02 % NP-40, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml X-gal )中、30℃で数時間発色を行った。

## 8. in situ ハイブリダイゼーション法

百瀬 剛 博士 (本研究室卒業生) によるプロトコルに従った。取り出した胚を PBS 中で洗浄後、4 % Paraformaldehyde/ MEM ( MOPS 2.09 g, EGTA 76 mg, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 24.6 mg / 100 ml dH<sub>2</sub>O, PH 7.4) 中 4℃で一晩固定した。PBST (0.1 % Tween 20/ PBS) で 2 回洗浄を行った後、1mg/ml Protenase K /PBST 中室温で約 15 分間静置した。PBST で洗浄後、0.1% Glutaraldehyde, 4 % Paraformaldehyde/ PBST 中で 15 分間、室温で再固定処理を行った。PBST で洗浄後、PBST から徐々に Hybridization mix (50 % Formamide, 1.3×SSC, 5 mM EDTA, 50 mg/ml Yeast RNA, 0.2 % Tween 20, 0.5 % CHAPS, 100 mg/ml Heparin ) へ液交換を行った。Hybridization mix 中で 68℃、1 時間前培養した。あらかじめ 80 °C で 5 分間熱処理した DIG 標識 RNA プローブを用いて、1 mg /ml プローブ/ Hybridization mix 中で 68 °C、10 数時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後の洗浄は、68 °C 条件下 Hybridization mix で 1 時間 (バッファー交換 2 回)、Hybridization mix から MABT (11.6 g/L Maleic Acid, 8.7 g/L NaCl, 11g/L Tween 20 /H<sub>2</sub>O ) への液交換、室温での MABT による洗浄 (約 20 分間) の順に行った。続くブロッキングは室温条件下、2 % Boehringer Blocking Reagent / MABT 中 1 時間、1/4 量の sheep serum を加えて数時間振とうして行った。1/2000 AP-anti-DIG 抗体/Blocking solution 中、4℃で一晩振とうさせた。抗体処理後、MABT でリンスした胚の後頭部にニードルで穴をあけ、内部に溜まった液を押し出すことにより発色時のバックの出現を防いだ。MABT で 1 時間 (バッファー交換 4、5 回)、続いて NTMT (0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl PH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % Tween 20 /H<sub>2</sub>O) で 20 分間 (バッファー交換 2 回) 洗浄した。4.5 mg/ml NBT solution (75 mg/ml NBT / 70 % Dimethylformamide), 3.5 mg/ml BCIP solution (50 mg/ml BCIP / Dimethylformamide) / NTMT 中、遮光して発色させた。

## 9. 頭部外胚葉のマッピング

キャピラリーを用いて 0.25% DiI (1,1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes) /N, N-Dimethylformamide を水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉の様々な領域に付着した。腹側頭部外胚葉への標識は頭部の周囲の膜を剥ぎ、頭部を尾側に反りかえらしてビテリン膜下に入れた泡で

固定後、行った。標識直後、蛍光顕微鏡 (MZ FL III, Leica)、CCD カメラ (HAMAMATSU)を用いて撮影した。インキュベーターに戻して24時間培養した後、同様に写真撮影を行い DiI 陽性細胞の移動を観察した。

#### 10. 凍結切片法

エレクトロポレーション、DiI 標識を行った胚、および未処理の胚を4% PFA/Hanks'-T 中で4℃で一晩固定を行った。Hanks'で20分洗浄した後、10%、20%、30% Sucrose/Hanks'の順に置換した(各15分)。続いて、Tissue Tec (Optimal Cutting Temperature Compound; SAKURA) 中に15分置いた後、同液を加えた CRYO DISH (硝英制作所) に胚を移し、液体窒素により凍結させた。凍結ブロックはクリオスタット (HM500-OM 型; ミクロトーム社、ミクロトーム替刃: S22 または C35; フェザー社) により 10 $\mu$ m の厚さに薄切しスライドグラス (スーパーフロスト ホワイト APS コート付; Matsunami) 上に置いた。その後、ドライヤーを用いて15分間風乾させた。

#### 11. パラフィン切片法

抗体染色および  $\beta$ -gal 染色後の胚を Hanks'で20分洗浄した後、25%、50%、75%、90%、100%、100% エタノール、続いて100%、100% キシレン、100%、100% パラフィン (Paraffin Station EG1160; Leica; 63℃) の順で各20分ごとに置換を行った。その後、パラフィンを加えた CRYO DISH (硝英制作所) に胚を移し室温で凝固させた。パラフィンブロックはロータリーミクロトーム (MICROM HM340E; カールツァイス) により 8~10 $\mu$ m の厚さに薄切りにし、スライドグラス (スーパーフロスト ホワイト APS コートなし; Matsunami) に置いた。切片は 44℃のパラフィン伸展器 (HANDEX; 白井松器機株式会社) 上で伸展および乾燥させた。

#### 12. 切片抗体染色法

試料をのせたスライドグラスを Hanks'-T (0.05% Tween20) で10分間3回洗浄し、Tissue-Tec を除いた。続いて100%メタノールで一回すすいだ後、新しい100%メタノール中で -20℃、20分間再固定した。Hanks'-T で10分間3回洗浄後、10%Goat Serum (GIBCO BRL, cat. #. S8441)/Hanks'-T 中、室温で1時間静置させた。Hanks'-T で軽くすすいだ後、PUPPEN (DAIDO SANGYO) で試料の周りをなぞり、2%BSA に希釈した一次抗体 (Sox2 2000倍希釈;  $\delta$ -クリスタリン 50倍希釈) を100ml ずつ加えた。室温で20分間静かに攪拌後、4℃で一晩静置させた。一次抗体を回収後、Hanks'-T で10分間3回洗浄した。Hanks'-T で1000倍希釈した二次抗体 (Alexa Flour 594, 488, 350 conjugated 抗マウスおよびラビット抗体; Molecular Probes) を加えて遮光、室温での攪拌20分間の後、4℃で一晩静置させた。二次抗体の除去、Hanks'-T による10分間3回の洗浄に続いて、DAPI 入りの包埋剤 (VECTASHIELD mounting medium for fluorescence; Vector Laboratory) もしくは退色防止剤 (1mg P-phenylene diamine/100% glycerol) を加えた。カバーグラスをマニキュアにより固定することで試料を封入した。Sox2 および  $\delta$ -クリスタリンの発現は蛍光顕微鏡 (AxioCam; ZEISS) を用いて観察し



た。

### 13. 大腸菌を用いた融合タンパク質の発現と精製

His-Sox2 融合タンパク質は pET6b-Sox2 を大腸菌 BL21 codon+ 株に導入させることで発現させた。タンパク質の発現、およびアフィニティーカラムによる精製方法は pET System (Novagen) の説明書、および本研究室卒業生 前川 真吾博士の一部改変したプロトコルに従った。アフィニティーカラムによる精製後は、12000MW 用の透析カップ (Bio-Tech MWCO 12000; 第一化学薬品株式会社) を用いて透析を行った。収量はブラッドフォード法により定量した。

### 14. 抗体の作製

11 週の SPF ウサギ雌 2 匹 (KITAYAMA LABES、長野県)、および 6 週 SPF ラット雄 4 匹 (CD(SD)IGS; Charles River Japan) に対し、それぞれ 300 $\mu$ g His-Sox2/500 $\mu$ l PBS、400 $\mu$ g His-Sox2/600 $\mu$ l PBS と等量の complete adjuvand (DIFCO) を三方活栓で連結した二本の 1ml 注射器 (テルモ) でよく混合したものを皮内、皮下もしくはウサギの場合のみ筋肉注射を行うと同時に少量採血を行った (初回免疫)。その 3 週間後、初回と同量の抗原と等量の incomplete adjuvand と混合したものを免疫した。採血はその一週間後行った。この免疫、採血の行程を計 3 回繰り返した。その間、採血した抗血清の抗体価の上昇を Dot Blot 法により確認した。4 回目の採血では全採血を行った。

なお、少量採血はウサギの場合、耳の内側をキシレンで拭くことにより膨張した血管にシリンジを押し込むことで採取した。ラットでは尾の先を切断して採血した。全採血はウサギの場合、耳の血管から可能なまで採血した後、筋弛緩剤ネブタール 500~1000 $\mu$ l を少しずつ注入し、心臓から採取した。ラットにおいては、エーテルを吸わせた後、腹の真中を切り開いて大静脈、および心臓から採血した (本学物質創成科学研究科 生体適合性物質科学講座の斎藤 充弘氏 による指導)。

### 15. ウエスタンブロット法

作成した抗 Sox2 抗体の抗原への特異性を検定するためにウエスタンブロット法を行った。大阪大学 細胞工学センター 近藤寿人教授より贈与された pCMV-cSox1,2 および 3 から TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Pro Mega) を用いて各 Sox タンパク質を合成させた。各反応液 0.1 $\mu$ l および 1 $\mu$ l を 10% SDS ポリアクリルアミドゲルに展開後、PVDF 膜 (Immobilon, MILLIPORE) にウエット法 (トランスファーバッファー: 8.2mM Tris 0.2M Glycine 20% Methanol, 20V cc O/N) によりブロッティングを行った。ボンソー S 液 (0.2% Ponceau S, 3% Trichloroacetic Acid, 3% Sulfosalicylic Acid) で 5 分間タンパク質を染色後、トランスファーされた部分、および分子量マーカーをボールペンで印した。PBS で洗浄後、5% SkimMilk/PBS で一時間ブロッキングを行った。5% Skim Milk/PBS で 2000 倍に希釈した抗 Sox2 抗体を室温、3 時間反応させた後、NET-2 液 (0.1% Tween, Tris-Cl pH8.0 10mM, EDTA 0.2mM, NaCl 3M) で 10 分 3 回洗浄した。続く 2 次抗体 (1000 倍希釈、anti-mouse Ig Ab. From sheep (HRP);

Amercham) 反応および洗浄も 1 次抗処理と同様の方法で行った。感光は ECL kit (Amercham)を用いて行った。

#### 16. ニワトリ網膜細胞の培養

孵卵後 8 日目胚から眼球をくり抜き、PBS に移して神経性網膜組織のみを切り出した。これを CMF (0.14M NaCl, 5mM KCl, 18% Glucose, 0.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24% HEPES, 0.5% phenol red PH 7.4) に移してハサミで 1-2mm 程度に細かく切り分けた後、終濃度 0.1%トリプシンを加えて 38℃のインキュベーター中 11 分間保温した。トリプシン溶液と等量の DMEM を加えて消化酵素反応を停止させた後、970 rpm 室温、五分間の条件で遠心した。遠心後の細胞を新しい DMEM に移して 10mm 径の培養皿 (Falcon) で培養した (初代培養)。さらに、2 週間後コンフルエントに達する直前の段階で 0.1%トリプシンで 7 分間処理を行い、同様な方法で 3mm 径の培養皿に移して継代した。またこの時、トランスフェクションの期日に細胞が培養皿の約 50%を占めるように濃度を考慮した。

#### 17. 培養細胞へのトランスフェクション

3mm 径の培養皿一枚につき、1ml OPTI-MEM、1 $\mu$ g プラスミド (pCAGGS、pCAGGS-GFP pCAGGS-L-maf、pCASFL-Sox2、pCMX-VP16-Pax6)を、続いて DMRI-C Reagent (GIBCO BRL)を 4 $\mu$ l を加えて数回転倒攪拌した後、室温で 20 分間静置した。その後 Hanks' で一回洗浄した培養細胞に対して DNA 溶液を加えて 6 時間、インキュベーター内で静置した。Hanks' で 2 回洗浄の後、DMEM を加えてさらに 5 日間培養した。

#### 18. 培養細胞の抗体染色法

本研究室卒業生 吉田 智則 博士のプロトコルに従った。遺伝子を導入後 5 日間培養した細胞を Hanks' で 2 回洗浄し、4%PFA/Hanks'-T で 4℃、30 分間固定した。Hanks'-T で 3 回洗浄し、10%Sheep serum/0.3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ Hanks'-T を加えて、室温で 30 分間ブロッキングを行った。Hanks'-T で 10 分間、2 回洗浄した後、各培養皿一枚あたり、抗  $\delta$ -クリスタリン産生ハイブリドーマ培養上清を 200 $\mu$ l ずつ加えた上に乾燥を防ぐためハイブリパックで覆い、室温で 1 時間静置した。Hanks'-T で 10 分間、3 回洗浄後、1/100 anti-mouse Ig Ab. From sheep (HRP) (アマシヤム) /10%Sheep serum/Hanks'-T を加えて室温で一時間反応させた。Hanks'-T で 10 分間、3 回洗浄した後、True Blue を加えて室温で 20 分間反応させた。反応後、水で 5 分間洗浄し、続いて 20%、40%、80%、100%エタノールで 3 分間ずつ反応させて水分を除いた後、風乾させた。

#### 19. ルシフェラーゼアッセイ

En-cCP2 の機能の検定のため、レポーター p $\alpha$ CE1 $\times$ 6  $\beta$ Luc もしくは p m $\alpha$ CE1 $\times$ 6  $\beta$ Luc 0.3 $\mu$ g、0.25 $\mu$ g pEF- $\beta$ -gal ( $\beta$ -gal コントロール)、0.25 $\mu$ g pUC111、0.01、0.05、0.1 $\mu$ g pCMXGLO-En-cCP2 もしくは pCMXGLO -cCP2 を上記の網膜培養細胞の場合と同様

な方法で12穴培地皿に培養させた293T cellにトランスフェクションした。293T cellの培養、およびトランスフェクションは本研究室卒業生 長谷川 武弘さんにより行われた。培養細胞はLysis buffer (25mM Tris-PO<sub>4</sub> (PH 7.8), 15% Glycerol, 2% CHAPS, 1% Lecithin, 1% BSA, 4mM egta, 8mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 0.4mM APMSF) により溶解させた。β-ガラクトシダーゼアッセイ: β-ガラクトシダーゼ基質溶液 (60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O, 10mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 11mM ONPG (o-Nitorophenyl-b-D-galactopyranoside), 43mM β-メルカプトエタノール) に細胞溶解液 20μl を加え、37℃、20 分間で反応させた。反応溶液が黄色に変化したことを確認の上、100μl 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> で反応を停止させた後、OD<sub>420</sub> を測定した。ルシフェラーゼアッセイ: ルミノメーター (Microtiter Plate Luminometer ML3000; ダイナテック) により 100μl のルシフェラーゼ基質溶液 (20mM Tris-NaOH PH 7.8, 1.07mM (MgCO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Mg(OH)<sub>2</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 2.64mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1mM EGTA, 33.3mM DTT, 270μM Coenzyme A, 470μM Luciferin-potacium salt (Molecular Probe), 530μM ATP) を細胞溶解液 20μl に自動注入し、ルシフェラーゼ活性を 15 秒間測定した。導入効率は β-ガラクトシダーゼ活性に対するルシフェラーゼ活性の比から求めた。また、同一の DNA 導入実験は 3 穴分行い、活性の平均と偏差を求めた。

尚、基本的な分子生物学的手法は、Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989) に準じた。

## 第三章 結果

### 第一節 $\delta$ -クリスタリンの発現制御機構の解析

転写因子 L-Maf は、水晶体プラコードが形成される時期より、水晶体系列細胞に特異的に発現し、水晶体特異的なクリスタリン遺伝子群やフィレンシン遺伝子の発現を誘導する。ニワトリ網膜細胞への強制発現では、水晶体細胞へ分化させることができる (Ogino and Yasuda, 1998)。また個体において L-Maf の機能を阻害すると水晶体プラコードが形成されないことが明らかになっている (Reza et al., 2002)。このことから、L-Maf は水晶体形成に必須の転写因子であることが予想される。L-Maf が水晶体誘導能を有しているのであれば、他の組織で発現させた場合においても水晶体、および水晶体分化マーカーを誘導する可能性が考えられた。

#### 1. L-Maf による種々の水晶体特異的因子の発現誘導

水晶体は頭部外胚葉由来の組織であり、眼胞により誘導される。L-Maf が水晶体誘導能を有しているのであれば、将来水晶体を形成しない、つまり眼胞に接していない他の頭部外胚葉領域においても、L-Maf を発現させるだけで水晶体の誘導は実現するのであろうか。このことを検討するため、エレクトロポレーション法を用いて L-Maf 発現ベクター (pCAGGS-FG-L-Maf) と GFP 発現ベクターを、水晶体プラコードの形成が開始される時期のニワトリ胚 (ステージ9後期~11) の頭部外胚葉全域に導入した (図5)。遺伝子導入後、さらに24時間発生を進行させた胚に対して、各水晶体分化マーカー、 $\alpha$ A-クリスタリン、CP49 (filensin like)、CP95 (filensin) の発現をホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法により検出した (図6)。L-Maf 発現ベクターが導入された領域が GFP のそれと一致していることは、確認済みである (図15)。どの領域に L-Maf を強制発現させても水晶体様の構造物の形成は確認されなかったが、それぞれの水晶体構成因子の mRNA の発現は、何れの領域においても検出された (図6a-i)。

#### 2. L-Maf の強制発現による $\delta$ -クリスタリンの発現誘導領域のマッピング

一方、 $\delta$ -クリスタリンの場合では、上記3つの因子と結果が異なっていた。同様に L-maf を導入した胚における  $\delta$ -クリスタリンに対する抗体染色の結果から、眼の周囲の表皮外胚葉領域では、 $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導されることが判明した (図7B, B')。一方、頭頂部や後頭部 (図7C, C') では、L-Maf を強制発現させても  $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導されなかった。L-Maf の強制発現実験の結果を総合すると、 $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導された領域は水晶体領域の周囲に限局し、特に水晶体領域の腹側で広範囲に発現することが判明した (図7D, 詳細は1999年度 島田 奈良先端大修士論文参照)。このように L-Maf により誘導される  $\delta$ -クリスタリンの発現に領域特異性が存在したことは、 $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導される領域とされない領域が

存在する (Ogino and Yasuda, 2000) という萩野の報告と一致する。またこの領域特異性が  $\delta$ -クリスタリンのみで確認されたことから、 $\delta$ -クリスタリンの発現制御機構は  $\alpha$ A-クリスタリン、CP95 および CP49 のそれとは異なっている可能性が示唆された。

### 3. L-Maf 強制発現後の早い時期における $\delta$ -クリスタリン発現誘導領域の特定

L-Maf の強制発現により誘導される  $\delta$ -クリスタリンの発現が一部の領域でしか検出されなかった理由として、 $\delta$ -クリスタリンの発現を観察した時期が、L-Maf の強制発現から 24 時間経過していたことが考えられた。つまり、その間に  $\delta$ -クリスタリンの発現レベルの変化や分解などが生じて発現領域が縮小した結果が、領域特異性として観察されている可能性が考えられた。L-Maf 強制発現から 7 時間目に (発生の進行があまりみられず、且つ  $\delta$ -クリスタリンの発現が十分に観察できる時期、図 8B)、*in situ* ハイブリダイゼーションを行い、 $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現する領域を観察した。その結果、 $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現は背側においては検出されなかったが (図 9Aa, a')、水晶体予定領域を含む lateral 側 (図 9Ac, c')、特に腹側において (図 9Ab, b') 広域に検出された。 $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現が検出された領域を図示すると図 9B のようになり、領域特異的であることが判明した。このことから、L-Maf 強制発現後 24 時間で検出された  $\delta$ -クリスタリンの発現の領域特異性は、早いステージでの結果がそのまま反映されたものと考えられた。実際、DiI 標識による頭部外胚葉のマッピングの結果 (図 32) によってもこの結果が支持された。

### 4. Sox2 による $\delta$ -クリスタリンの発現領域の拡大

L-Maf の強制発現により  $\delta$ -クリスタリンの発現が頭部外胚葉の限局した領域で誘導された。このことを説明する一つの可能性として、 $\delta$ -クリスタリンの誘導には L-Maf のみでは不十分であり、他の因子が必要であることが考えられた。もしこれが事実であれば、この因子を L-Maf と共に頭部外胚葉に導入すると、L-Maf のみでは  $\delta$ -クリスタリンを誘導できない領域においても、誘導が可能であることが予想された。その因子の候補として、水晶体形成に関わる因子、Pax6、Sox2、Six3、Prox1 および ATF4 が挙げられた。特に前者 4 つは、 $\delta$ -クリスタリンの発現制御に関与していることで知られている (Kamachi et al., 2001; Reza et al., 2002; Zhu et al., 2002)。ATF4 の  $\delta$ -クリスタリン発現制御への関与は明らかでないが、L-Maf と同様 bZip 型転写因子であり、c-Maf と二量体を形成できること (Motohashi et al., 1997)、および水晶体細胞の繊維化に働いていることが報告されている (Tanaka et al., 1998; Hettmann et al., 2000)。これらの因子が  $\delta$ -クリスタリンの発現に与える影響を調べるため、エレクトロポレーション法を用いて、これらの因子を L-Maf と共に頭部外胚葉の様々な領域に導入した。その結果、Pax6、および Six3 を共導入した場合、 $\delta$ -クリスタリンが誘導される領域に変化はみられなかった (図 10A-B')。L-Maf と Prox1 および ATF4 との共導入では、頭部外胚葉のより広範な領域で  $\delta$ -クリスタリンの発現が検出されたが、その発現自体は点在して確認されるにすぎなかった (図 10C-D')。一方、L-Maf と Sox2 を共導入した場合、頭部の全域において強い  $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導した (図 10E, E')。

Sox2 単独では、Kamachi et al.による報告通り (2001)、水晶体の極近傍でのみ弱く  $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導するだけであった (図 10F, F')。よって、L-Maf は Sox2 と協調して  $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導していることが示唆された。また、これらの強制発現後、検出された  $\delta$ -クリスタリン陽性細胞の多くが繊維状に伸張しているのが観察された (図 10E'')。このことから、水晶体の分化の段階においても L-Maf と Sox2 の協調作用が働くことが予想された。

一方で、 $\delta$ -クリスタリンの発現には、 $\delta$ -クリスタリンエンハンサーを介した Sox2 と Pax6 との相互作用が必要であることが報告されている (Kamachi et al., 2001)。このことから、L-Maf、Sox2、Pax6 の三者を共導入することで、 $\delta$ -クリスタリン誘導能がさらに増強されることを予想した。これら三者を頭部外胚葉に導入した場合、誘導される  $\delta$ -クリスタリンの発現は L-Maf と Sox2 二者を導入した場合と比較して変化はみられなかった (図 10G, G')。この結果から、 $\delta$ -クリスタリンの発現誘導においてはこれら三者による協調作用は無い、もしくは小さく、L-Maf と Sox2 の二者がその発現誘導に主要な役割を担っていることが示唆された。

#### 5. L-Maf と Sox2 による隆起状構造物の誘導

L-Maf と Sox2 の強制発現により、繊維状の細胞が観察されたことから (図 10E'')、両者が水晶体分化においても協調して働くことが予想された。もしこれが事実であるなら、強制発現後の培養時間を延長することで、より水晶体に近い組織を誘導することが可能ではないかと考えた。そこでエレクトロポレーションにより、L-Maf と Sox2 を水晶体付近の頭部外胚葉に強制発現後、三日間培養した。その結果、これらが多く導入された部分において、隆起した構造物が誘導されていることが確認された (図 11)。また、L-Maf 単独の場合ではこのような構造物を誘導しないことから (データ示さず)、L-Maf と Sox2 の両者が水晶体の形態形成 (誘導や細胞増殖) においても何らかの役割を果たしていることが予想された。

#### 6. 培養細胞における L-Maf と Sox2 の協調作用

個体において  $\delta$ -クリスタリンの発現誘導における L-Maf と Sox2 の協調作用が示された。また、その時の誘導能は Sox2 と Pax6 の共導入の場合 (図 22D, D', Kamachi et al., 2001) と比較して高かった。このことから、L-Maf と Sox2 が  $\delta$ -クリスタリン誘導のメジャープレイヤーであると予想される。しかし、これらの因子の関係を生化学的手法を用いてより定量的に解析するには、個体レベルのアッセイでは限界がある。一方、培養細胞を用いて同様な結果が得られれば、このような解析が可能になると期待された。ニワトリ網膜培養細胞に L-Maf と Sox2 および Pax6 の発現ベクターを様々な組み合わせで導入後、五日間培養し、 $\delta$ -クリスタリンの発現を抗体染色により調べた (図 12)。L-Maf と Sox2 による  $\delta$ -クリスタリン誘導能は (図 12E)、L-Maf 単独の場合 (図 12B) と比較して高かった。このことから培養細胞においても、両者の  $\delta$ -クリスタリン誘導における協調作用を検出できたことになる。一方、Sox2、Pax6 を単独、もしくは両者を導入した場合、 $\delta$ -クリスタリンの発現はほとんど検出されず (図

12C, D, F)、個体を用いた場合 (図 22D, D') と類似していた。このことから、培養系を用いたこれらの分子の機能解析は適切であると考えられた。

7. L-Maf による  $\delta$ -クリスタリンの発現誘導には Sox2 が必要である。

頭部外胚葉において L-Maf 単独で  $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導できない領域においても、Sox2 と共に強制発現することにより、その発現が誘導されることが明らかになった (図 10E, E')。この結果から、Sox2 は  $\delta$ -クリスタリンの発現自体に必須であることが予想された。もしこれが事実であれば、L-Maf 単独を導入して  $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導された領域と内在性の Sox2 が発現している領域が一致している可能性が考えられた。これについて検討するため、ラビットより作製した抗 Sox2 抗体 (図 13) を用いたホルマウント抗体染色法により、ステージ 18 胚の Sox2 の発現を調べた。その結果、Sox2 の発現は水晶体、脊椎などの神経組織や鼻プラコードを含む腹側の表皮外胚葉のみでみられ (図 14A)、*in situ* ハイブリダイゼーション法による結果 (図 14A 右上) と一致していた。しかし、頭部外胚葉における Sox2 の発現は弱く、発現領域の特定は困難であった。次に、Sox2 の検出感度を高めるため、頭部の各部分の切片を用いて抗体染色を行った。水晶体付近の頭部外胚葉において Sox2 は、眼胞に裏打ちされた腹側の領域で検出された (図 15B)。この発現領域は切片 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った場合の結果 (Kamachi et al., 1998) と一致している。頭部の他の部分の結果 (図 14C) と統合すると、Sox2 の発現領域は L-Maf の強制発現により得られた  $\delta$ -クリスタリン誘導領域 (図 14C 模式図) と類似していた。

次に、L-Maf を導入した場合、内在性 Sox2 が発現している領域内でのみ  $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導されるかどうかを二重染色法を用いて調べることにした。L-Maf が導入された領域 (図 15A) は、頭部腹側の広い領域に及んでいたが、 $\delta$ -クリスタリンの発現 (図 15C) は Sox2 の発現している領域内 (図 15B) でのみ観察された。従って、L-Maf による  $\delta$ -クリスタリンの発現誘導には内在性 Sox2 が必要であると結論した。

8. Sox2 による  $\delta$ -クリスタリンの発現時間の短縮

L-Maf と Sox2 との共発現により誘導される  $\delta$ -クリスタリンの発現領域は、L-Maf 単独を発現させた場合より広い領域に及んでいた (図 10E, E')。この結果は、L-Maf と Sox2 の両者が揃って初めて  $\delta$ -クリスタリンを誘導できることを示すのみであるのか。それとも、Sox2 が転写の活性化を促進することも示しているのであろうか。実際、Sox2 単独では自身の転写活性化能を発揮できず、パートナーの存在が必要であることが明らかになっている (Kamachi et al., 1999)。このことから、L-Maf と Sox2 の場合においても同様のことが当てはまることが予想された。Sox2 による  $\delta$ -クリスタリンの転写活性化に及ぼす影響を検討する一つの方法として、L-Maf と Sox2 両者では L-Maf 単独の場合と比較して、 $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現を早く誘導する可能性を調べることを考えた。エレクトロポレーション法を用いて、ステージ 9-11 の胚の頭部外胚葉に L-Maf 単独、および L-Maf と Sox2 を共導入後、 $\delta$ -クリスタリン mRNA

の発現が誘導される時間を *in situ* ハイブリダイゼーション法により調べた。L-Maf 単独を強制発現させた場合、 $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現は 4.5 時間後に検出された (図 16B, B')。一方、L-Maf と Sox2 を共導入した場合、 $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現は 2 時間後では検出されなかったが (図 16C, C')、2.5 時間後からは検出され始めた (図 16D, D')。すなわち、Sox2 との共発現により、 $\delta$ -クリスタリン mRNA の検出時間が 2.5 時間短縮されたことになる。よって、Sox2 は  $\delta$ -クリスタリンの転写活性化を促進することが判明し、転写活性化における L-Maf との協調作用が示唆された。

Sox2 と Pax6 を共導入した場合では、 $\delta$ -クリスタリンの発現が検出される時間は 9 時間と、L-Maf 単独の場合より長時間であった (図 16F, F')。この検出までの時間の長さから、 $\delta$ -クリスタリンは Sox2 と Pax6 により直接誘導されている (Kamachi et al., 2001) というよりはむしろ、L-Maf を介した誘導 (Resa et al., 2002) がメインである可能性が考えられた。

### 9. $\delta$ -クリスタリンエンハンサーを用いた *in ovo* レポーターアッセイ

図 12 で Sox2 により  $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現の検出時間が早くなったことから、L-Maf と Sox2 は協調して  $\delta$ -クリスタリンの転写を推進していることが示唆された。では、これらの協調作用はどのような機構により引き起こされるのか。 $\delta$ -クリスタリンの第 3 イントロンにはエンハンサー配列が存在する (Hayashi et al., 1987; Funahashi et al., 1991)。このエンハンサー上には Maf および Sox2 結合配列が存在し、そのうちいくつかの配列でこれらが結合すること、および Sox2 が Pax6 と協調してこのエンハンサー中の水晶体特異的なコア領域 DC5 を活性化することが明らかにされている (Ogino and Yasuda, 1998; Kamachi et al., 2001; Muta et al., 2002)。これらの知見から、両者による協調作用はこのエンハンサーを直接介して引き起こされることが予想された。このことを検討するため、DC5 配列を含んだ  $\delta$ -クリスタリン第 3 イントロンの一部の領域 (BHd, 図 17) に LacZ 遺伝子を連結したものをレポーター遺伝子として、*in ovo* レポーターアッセイを行った (図 18)。まず、レポーターのみを頭部外胚葉に導入した場合、水晶体領域でのみ (図 18A, A')、しかも将来の水晶体上皮細胞および繊維細胞の何れにおいても (図 18B, C) レポーター活性が検出された。レポーターと L-Maf もしくは Sox2 との共導入では、弱い  $\beta$ -gal シグナルが検出された (図 18D-E')。一方、レポーター、L-Maf および Sox2 の三者を共導入すると、レポーター活性の増加が観察された (図 18F, F')。この結果は、レポーター、Sox2 および Pax6 を共導入した結果 (図 18G, G') と類似していた。よって、L-Maf と Sox2 は  $\delta$ -クリスタリンエンハンサーを介して協調的に転写活性化を促進していることが判明した。一方、DC5 を含む短い領域 (HN) を 6 つ連結したレポーター遺伝子 (図 17) を用いた場合 (図 19)、Pax6 と Sox2 による協調作用は検出されたが (図 19E, E')、L-Maf と Sox2 の場合は確認されなかった (L-Maf 単独の場合 (図 19B, B')) と同様のレポーター活性、図 19D, D')。よって、この領域は、これらの因子による協調作用を実現するには不十分であることが示唆された。



#### 10. $\delta$ -クリスタリンの発現誘導における L-Maf と Sox2 の物理的相互作用について

最近、L-Maf の転写活性化領域とヒンジ領域 (AH ドメイン) を VP16 および c-Maf の AH ドメインに置き換えた変異型 L-Maf は、培養系において L-Maf 結合配列を連結したレポーター遺伝子の転写は活性化するが、 $\delta$ -クリスタリンの誘導活性は示さないことが報告された (Yoshida and Yasuda, 2002; Yoshida and Yasuda, unpublished data)。このことから、L-Maf の AH ドメインは c-Maf のそれとは別の機能を有しており、 $\delta$ -クリスタリンの発現の誘導に必要な何らかの因子との結合に関与している可能性が示唆された。この因子の候補として Sox2 が挙げられた。Sox2 は L-Maf による  $\delta$ -クリスタリンの誘導に必要であり、かつ L-Maf と協調してその転写活性をエンハンスすることから、L-Maf と直接相互作用する可能性は十分考えられる。この可能性について検討するため、各変異型 L-Maf (AH ドメイン欠損型/L(92-132)-bZip、VP16 ドメイン置換型/VP16-LbZip、ヒンジ領域欠損型/L $\Delta$ H) と Sox2 を水晶体プラコード形成時期の頭部外胚葉に強制発現後、抗体染色法により  $\delta$ -クリスタリンの発現を調べた。各変異型 L-Maf はいずれも単独では  $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導できなかった (図 20B-D)。一方、これらの変異型 L-Maf と Sox2 を共発現させた場合、いずれも野生型 L-Maf を用いた場合と同様、頭部外胚葉の広域で  $\delta$ -クリスタリン誘導活性を示した (図 20F-H)。すなわち、Sox2 は  $\delta$ -クリスタリンの発現誘導に必須であるが、少なくとも L-Maf AH 領域と相互作用しないことを示している。よって、Sox2 が L-Maf の他の領域と相互作用している可能性、もしくは何らかの因子を介して間接的に相互作用している可能性が推測された。

#### 11. Sox2、Six3、Pax6 各組み合わせが $\delta$ -クリスタリンの発現に及ぼす影響

図 10 で、L-Maf と水晶体形成に関与する他の転写因子を共に強制発現させることで  $\delta$ -クリスタリンの発現誘導に与える影響を解析した。しかし、これらの因子が L-Maf を介さずに互いに協調して  $\delta$ -クリスタリンの発現、および水晶体形成に何らかの役割を果たしている可能性は否定できない。そこで、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉にこれらの因子を単独、または様々に組み合わせて導入し、 $\delta$ -クリスタリンの発現に及ぼす影響を調べた。Sox2 を強制発現させた場合、Kamachi et al による報告通り (2001)、水晶体のごく近傍でのみ  $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導された (図 22A, A', 図 10F, F')。これは内在性の Pax6 の発現に依存していると予想される。また、水晶体の形態異常 (3/9) も観察された。Pax6 の強制発現では  $\delta$ -クリスタリンの発現に影響を与えなかった (図 22B, B', Kamachi et al., 2001; Reza et al., 2002)。Sox2 と Pax6 を共発現させた場合、異所的な  $\delta$ -クリスタリンの発現、および水晶体プラコードが検出され (図 22D, D'), Kamachi et al.による報告 (2001)と一致した。しかし、その発現は L-Maf と Sox2 の共発現の結果と比較して弱かった。Six3 を水晶体に導入した場合、 $\delta$ -クリスタリンの発現に変化がみられなかった (図 22C, C')。この結果は、 $\delta$ -クリスタリンの発現が抑制されるという最近の報告 (Zhu et al., 2002) と異なっていた。Six3 を Sox2 または Pax6 と共発現させた場合においても、 $\delta$ -クリスタリンの発現には影響しなかった (図 22E-F')。

## 12. L-Maf、Sox2、Pax6、Six3 が互いの発現に及ぼす影響

L-Maf、Sox2、Pax6 および Six3 間の上下関係を明らかにする目的で、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉にこれらの因子を単独、および様々な組み合わせで強制発現後、互いの発現に与える影響を *in situ* ハイブリダイゼーションにより調べた。

以前に Sox2 と Pax6 が L-Maf の発現を誘導すること、および Pax6 単独では誘導できないこと (Reza et al., 2002) が明らかにされていたが、Sox2 による L-Maf 誘導の可能性は検討されていなかった。そこで Sox2 を水晶体付近に導入すると、水晶体のごく近傍でのみ異所的な L-Maf の発現が観察された (図 23A, A')。このことから、Sox2 は内在性の Pax6 に依存して L-Maf を誘導していることが示唆された。

L-Maf が Sox2 誘導能を有しているのであれば、L-Maf と Sox2 の共発現でみられた  $\delta$ -クリスタリン発現の増強効果が、実は Pax6 と増加した Sox2 による L-Maf、もしくは  $\delta$ -クリスタリン誘導作用によっても引き起こされている可能性が考えられた。実際、L-Maf を強制発現させた場合、異所的な Sox2 mRNA の発現は検出されなかった (図 23B, B')。よって、上記の可能性は否定された。また、同様に L-Maf と Sox2 の共発現による  $\delta$ -クリスタリンの発現の増強が、Pax6 の発現を増強させたことに起因している可能性が考えられた。そこで L-Maf と Sox2 を単独、および両者の共導入により Pax6 mRNA の発現が誘導されるかを検討した。その結果、Sox2 単独では水晶体の近傍で弱い Pax6 の発現を誘導した (図 23D, D')。この結果は、最近の報告 (Kamachi et al., 2001) と一致している。L-Maf 自身は Pax6 誘導能を持たず (図 23C, C')、Sox2 と共発現しても、増強されなかった (図 23F, F')。これらの結果より、Sox2 が Pax6 の発現を補うことで、結果的に L-Maf および  $\delta$ -クリスタリンの発現の誘導を促進するという精巧な機構の存在が推測された。

マウスにおいて Pax6 と Six3 が互いの発現の誘導に関わっている可能性が示唆されていた (Goudreau et al., 2002)。ニワトリにおいて同様な機構が存在するのかを検討するため、Pax6 および Six3 を強制発現させた胚において、他方の mRNA の発現を調べた。その結果、何れの場合においても異所的な発現誘導は観察されなかった (図 23E, E', G, G')。このことから、ニワトリにおいては、Pax6 と Six3 による遺伝学的相互作用は存在しないことが判明した。

Six3 は  $\delta$ -クリスタリンの発現に対して抑制的に機能することが報告されている (Zhu et al., 2002)。では、Six3 は  $\delta$ -クリスタリン発現誘導に機能する Pax6、Sox2 および L-Maf と同じ遺伝子カスケード上に属しているのだろうか、もしくは独立のカスケードから抑制効果を発揮しているのか。このことを明らかにするため、Pax6、Sox2、L-Maf を様々な組み合わせで頭部外胚葉に導入し、Six3 の発現に与える影響を観察した。その結果、いずれの組み合わせを導入しても Six3 の発現に変化はみられなかった (図 23H-L')。よって、Six3 は少なくともこれらの因子の下流には存在しないことが予想された。

## 第二節 cCP2 の機能解析

$\alpha$ A-クリスタリン遺伝子のもう一方のエンハンサー配列  $\alpha$ CE1 は、培養系における実験より、 $\alpha$ CE2 と協調して下流の  $\alpha$ A-クリスタリン遺伝子の水晶体特異的な転写活性を促進することが確認されていた。 $\alpha$ CE1 に結合する因子としては転写因子 cCP2 が同定されている。CP2 ファミリーは様々な遺伝子の組織特異的な発現制御に関わっていることで知られている。cCP2 はマウス赤血球特異的に発現する  $\alpha$ -グロビン遺伝子のプロモーターに結合する転写因子 CP2 と高い相同性を示す。水晶体細胞において cCP2 は  $\alpha$ CE1 を介したレポーター遺伝子の転写を活性化する。また、 $\alpha$ CE2 に結合する L-Maf と協調してエンハンサー活性を実現することが培養系において明らかにされている (村田 1998 年度 奈良先端大 博士論文)。このように培養系における  $\alpha$ CE1 および cCP2 の機能解析はなされてきたものの、生体内においてこれらが  $\alpha$ A-クリスタリン遺伝子の水晶体特異的な発現制御、および水晶体形成にどのように機能しているのかについての検討はされていなかった。そこで、以下の実験を行い、個体における  $\alpha$ CE1 および cCP2 の機能を解析した。

### 1. 個体において cCP2 は L-Maf と協調して $\alpha$ A-クリスタリンの転写を活性化する。

$\alpha$ A-クリスタリンの二つのエンハンサー配列、 $\alpha$ CE1 と  $\alpha$ CE2 が協調的にエンハンサーを活性化することが培養系におけるの実験で明らかにされていた (Murata et al., 1998)。しかし、個体においてこれらのエンハンサー配列が同様な機能を有するのか、およびそれらに結合する cCP2 や L-Maf が協調的な転写の活性化に働くかどうかの知見は得られていなかった。そこで、 $\alpha$ CE1 と  $\alpha$ CE2 を含んだ  $\alpha$ A-クリスタリン遺伝子上流 244bp ( $\alpha$ 244) を連結した LacZ 遺伝子を用いて、*in ovo* レポーターアッセイを実施した。水晶体領域の周囲にこのレポーターを単独で導入した場合 (図 24A)、レポーター活性は検出されなかった (図 24A')。レポーターと cCP2 を共導入したところ、レポーター活性はほとんど検出されなかったが (図 24AC, C')、ドミナントアクティブ型 cCP2 (VP16-cCP2) に置き換えると、水晶体の内外で弱い活性がみられた (図 24D, D')。またレポーターと L-Maf を共導入した場合、弱いレポーター活性が検出された (図 24B, B')。これらの結果から、個体において cCP2 と L-Maf は単独で  $\alpha$ A-クリスタリンエンハンサーを介した弱い転写活性化能を持つことが示された。次に、この  $\alpha$ 244 レポーターを cCP2、L-Maf と共導入したところ (図 24E)、水晶体予定域およびその周囲において、それぞれを単独を導入した場合より強いレポーター活性が観察された (図 24E')。すなわち、個体において L-Maf と cCP2 の両者は協調して  $\alpha$ A-クリスタリンの転写を活性化していることを示唆しており、培養系で確かめられた結果 (村田 1998 年度 奈良先端大 博士論文) と一致していた。

### 2. cCP2 は水晶体において $\alpha$ CE1 を介したレポーター活性を示さない。

個体において  $\alpha$ CE1 は培養系の結果と同様、水晶体特異的なエンハンサー活性を示すのであろうか。また、cCP2 は  $\alpha$ CE1 を介した標的遺伝子の転写活性化を実現で

きるのであろうか。これらのことを明らかにするため、ステージ 9<sup>+</sup>11 の胚の水晶体周辺の頭部外胚葉に、各型の cCP2 (野生型、ドミナントアクティブ型 (VP16-cCP2) および、DNA 結合ドメイン (189-239aa) を欠失したドミナントネガティブ型 ( $\Delta$ DBD-cCP2)) の発現ベクターを lacZ 遺伝子上流に  $\alpha$ CE1 を連結したレポータープラスミドと共に導入し、レポーター活性を調べた。レポーター単独を導入した場合、レポーター活性は検出されなかった (図 25A)。レポーターと cCP2 との共導入では、水晶体の周囲の外胚葉においてレポーター活性が検出されたが、水晶体内では検出されなかった (図 25B, C)。VP16-cCP2 は、野生型 cCP2 より高いレポーター活性を示したが、その領域は野生型と同様、水晶体外の表皮外胚葉に限られていた (図 25D)。一方、 $\Delta$ DBD-cCP2 の場合、レポーター活性が全く検出されなかった (図 25E)。従って、個体において cCP2 は、DNA 結合ドメインを介して  $\alpha$ CE1 に結合し、転写を活性化すること、およびその活性化は水晶体内では確認されないことが判明した。後者の原因として、水晶体内においてのみ cCP2 若しくは  $\alpha$ CE1 に対して抑制的に作用する因子が存在した可能性、もしくは cCP2 が転写抑制作用を有していた可能性が考えられた。 $\alpha$ CE1 配列の 3' 側には水晶体特異的なエンハンサー活性を実現するための LSE (Lens-specific element) の存在が確認されていることから (Murata et al., 1998)、今回得られた結果はこの報告と矛盾することになる。

### 3. cCP2 は L-Maf による $\alpha$ CE2 を介した転写活性化を抑制する。

cCP2 は水晶体内では  $\alpha$ CE1 を介したレポーター活性を示さなかった (図 25B, C)。この cCP2 による負の作用は、 $\alpha$ A-クリスタリンエンハンサー上で  $\alpha$ CE1 と隣接する  $\alpha$ CE2、およびそれに結合する L-Maf に何らかの影響を及ぼす可能性はあるのか。このことについて検討するため、 $\alpha$ CE2 に lacZ 遺伝子を連結したものをレポーターとして、L-Maf や cCP2 の発現ベクターと共に水晶体付近の頭部外胚葉に導入した。L-Maf は水晶体の内外でレポーター遺伝子を転写活性化した (図 26A, A'、詳細は 1999 年度 島田 奈良先端大 修士論文参照)。しかし、L-Maf と cCP2 を共に導入した場合、レポーター活性は水晶体を除く周囲の頭部外胚葉でのみ検出された (図 26B-C')。よって、水晶体において cCP2 は、 $\alpha$ CE1 を介した自身の転写活性化能を示せないだけでなく、L-Maf による  $\alpha$ CE2 を介した転写活性化をも抑制することが判明した。

### 4. cCP2 が水晶体形成に与える影響

これまでの *in ovo* レポーターアッセイの結果から、 $\alpha$ A-クリスタリンエンハンサー上の cCP2 の複雑な作用が示唆された。では、cCP2 は  $\alpha$ A-クリスタリンの発現制御のみならず、水晶体発生においても何らかの役割を果たしているのであろうか。またこの場合、L-Maf との協調作用が必要であるのか。このことを検討するため、ステージ 9<sup>+</sup>11 の胚の水晶体予定領域に野生型 cCP2、ドミナントアクティブ型 (VP16-cCP2) および、ドミナントネガティブ型 ( $\Delta$ DBD-cCP2) の発現ベクターを単独、および L-Maf と共に導入後、水晶体分化初期マーカーである  $\delta$ -クリスタリンの発現を抗体染色法により調べた。また、その染色により浮かび上がる水晶体の形態を観察した。

胚の表現型：いずれの型の cCP2 を導入した胚においても、眼胞の形が歪んだものが少数確認されたが、表現型に大きな変化はみられなかった (図 27Aa', Ba', Ca')。一方、野生型 cCP2 及び VP16-cCP2 と L-Maf の共導入では、導入された領域を境とした水晶体予定域の分離 (横断、および縦断)、その結果としての水晶体の重複が確認された (図 27Ab', Cb', c')。また、ここで形成された複数の水晶体は正常のものと同様に陥入していた (図 27Cc')。このような異常な表現型を示した胚の割合は、野生型 cCP2 を用いたときで 2/9 (L-Maf:cCP2 =1:1-1/4, 1:3-1/5)、VP16-cCP2 を用いたときで 2/7 (L-Maf:cCP2=1:1-1/4, 1:3-1/3)であった。一方、 $\Delta$ DBD-cCP2 と L-Maf との共導入では、表現型に変化はみられなかった (図 27Bb')。これらの結果から、少なくとも cCP2 は水晶体の陥入に対して抑制的に働くことが予想された。また、その抑制効果が L-Maf と共に導入した場合において観察されたことから、少なくとも cCP2 は水晶体の形成の過程で L-Maf と何らかの関与をしているものと推察できる。

$\delta$ -クリスタリンの発現：野生型 cCP2 および  $\Delta$ DBD-cCP2 の強制発現では、内在性の  $\delta$ -クリスタリンの発現に変化がみられなかった (図 27Aa', Ba')。一方、VP16-cCP2 の場合、水晶体内の多く入った部分で  $\delta$ -クリスタリンの発現が抑制されていた (図 27Ca')。各型の cCP2 と L-Maf を共導入した場合、いずれも水晶体周囲の外胚葉において異所的な  $\delta$ -クリスタリンの発現が抑制されていた。しかもその抑制は水晶体から距離が離れるほど強くなる傾向がみられた (図 27Ab', Bb', Cb', c')。以上の結果より、cCP2 が  $\delta$ -クリスタリンの発現に対して抑制作用を示すこと、およびその領域は *in ovo* レポーターアッセイの結果と対照的であることが判明した。また、DNA 結合領域を欠失した  $\Delta$ DBD-cCP2 であっても、水晶体より遠位の頭部外胚葉において  $\delta$ -クリスタリン の発現誘導を阻害した (図 27Bb')。このことから、cCP2 の抑制作用は DNA 結合ドメイン以外の部分が有している可能性が示唆された。

#### 5. cCP2 による $\delta$ -クリスタリンの発現抑制の分子機序

4.で、cCP2 と L-Maf を強制発現させた場合、水晶体周囲の外胚葉において  $\delta$ -クリスタリンの発現が抑制された。この cCP2 による抑制機構を説明する一つの可能性として、L-Maf はおそらく  $\delta$ -クリスタリン遺伝子を直接の標的とすることから (第一節参照)、L-Maf 自身の転写活性化から  $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導されるの間のある段階で cCP2 による抑制が働くことが考えられた。このことを検討するため、cCP2 と L-Maf を GFP と共に強制発現させた胚に対して、L-Maf、および  $\delta$ -クリスタリンの発現を、抗体染色法、および *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。L-Maf mRNA および L-Maf の発現は共導入した GFP の発現と一致していた (図 28A, B)。一方、 $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現は蛋白質の発現と同様、水晶体周囲から離れた外胚葉において抑制されていた (図 28C)。以上の結果より、cCP2 は  $\delta$ -クリスタリン mRNA が発現する段階、つまり  $\delta$ -クリスタリン遺伝子の転写の段階を抑制していることが判明した。

## 6. cCP2 の抑制作用に転写活性化能は関与しない。

水晶体より外側の頭部外胚葉において cCP2 は、 $\alpha$ CE1 を介した転写活性化能を示した (図 25)。一方、同じ領域で  $\delta$ -クリスタリンの転写活性化に対して抑制的に作用した。また、この抑制作用は  $\Delta$ DBD-cCP2 においても確認された (図 27Bb')。これらの結果から、個体における  $\delta$ -クリスタリンの抑制作用に cCP2 自身の転写活性化能が関与している可能性が考えられた。このことについて検討するため、cCP2 の転写活性化能を発揮できないコンストラクト En-cCP2 を作製し、 $\delta$ -クリスタリンの発現に及ぼす影響を観察することとした。En を cCP2 の N 末端側に配すると  $\alpha$ CE1 を介した転写抑制作用を持つことを培養系において確認した (図 29A)。次に、En-cCP2 を頭部外胚葉の水晶体領域付近に導入した場合、内在性の  $\delta$ -クリスタリンの発現には変化がみられなかった (図 29Ba, a')。一方、En-cCP2 を L-Maf と共に導入すると、cCP2 の場合と同様、水晶体に隣接していない頭部外胚葉において異所的な  $\delta$ -クリスタリンの発現の抑制が観察された (図 29Bb, b')。また、En-cCP2 と L-Maf、cCP2 三者を導入した場合でも同様の結果が得られた (図 29Bc, c')。これらの結果から、個体において En-cCP2 は  $\delta$ -クリスタリンの発現に対して cCP2 と同様の機能を有しており、cCP2 自身の転写活性化能はその抑制作用に関与しないことが示唆された。

## 7. cCP2 が水晶体形成に関与する他の転写因子の発現に与える影響の検討

個体における cCP2 の機能解析から、水晶体形成の異常、および  $\delta$ -クリスタリンの発現の抑制が観察された (図 26)。このことから cCP2 は水晶体の発生過程で  $\alpha$ A-クリスタリンの転写に関与しているだけでなく、水晶体形成に関わる他の因子の発現にも何らかの影響を与えている可能性が考えられた。このことについて検討するため、頭部外胚葉に cCP2 を単独、または L-Maf と共に強制発現させた胚について、水晶体形成に重要な役割を果たす Pax6、Six3、および Sox2 の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。L-Maf や cCP2 を単独で強制発現させた場合、もしくは L-Maf と cCP2 を共発現させた場合において、いずれにおいても Six3、および Sox2 の発現に変化はみられなかった (図 30B, C)。一方、Pax6 の発現は L-Maf 単独を強制発現させた胚では影響はみられなかったが (図 30Aa, a')、cCP2 のみ、もしくは cCP2 と L-Maf を共に強制発現させた胚においては、僅かであるが誘導されていた (図 30Ab-c')。cCP2 が水晶体のマスター制御因子である Pax6 の発現を誘導したことから、それが二次的な効果によるものであれ、cCP2 が水晶体形成の遺伝子カスケードの中で何らかの役割を担っていることが予想された。

## 8. 個体における cNF2d9 の機能

cCP2 は四量体である  $\alpha$ CEF1 を構成する二種のサブユニットの一つであり、もう一つの構成因子として cNF2d9 が同定されている (村田 1998 年度 奈良先端大 博士論文)。cNF2d9 は cCP2 とアミノ酸レベルで 72% の相同性を有し、また  $\alpha$ CE1 を介してレポーター遺伝子の転写を活性化できることが明らかとなっている (Murata et al., 1998)。このことから、cNF2d9 は cCP2 と同等の機能を持ち合わせていることが予想

された。では、個体においても cNF2d9 は cCP2 を導入した時と同様な挙動を示すのであろうか。このことを検討するために、cNF2d9 単独、および L-Maf と共に個体に導入し、 $\delta$ -クリスタリンの発現に与える影響を観察した。cNF2d9 単独を水晶体を含む頭部外胚葉に導入した場合、内在性の  $\delta$ -クリスタリンの発現に変化はみられなかった (図 31A, A')。cNF2d9 と L-Maf と共に導入した場合、 $\delta$ -クリスタリンの発現は L-Maf を単独で導入した場合と同様であった (図 31B, B')。つまり、cNF2d9 は cCP2 でみられたような  $\delta$ -クリスタリンの発現に対する抑制効果を示さず、機能的には cCP2 と異なる部分を有することが示唆された。

### 第三節 頭部表皮外胚葉細胞のマッピング

水晶体は、眼胞に裏打ちされた円形の頭部表皮外胚葉 (後の水晶体プラコード) より形成されることが、8-somite ステージ胚を用いたトレース実験により示されており (Webb and Noden, 1993)、今日においても既成の事実とされている。それゆえに、水晶体プラコード形成期以降にこれらを形成する細胞、および周囲の細胞がどう移動し、最終的に水晶体組織が形成されるのかという詳細な観察は為されて来なかった。しかし、実際の水晶体の陥入現象は複雑である。例えば、水晶体の陥入はプラコード全体で均一には起らず、腹側より陥入しているように見受けられる。また、SEM による観察から、水晶体プラコードより腹側の外胚葉において他の外胚葉とは形状の異なる細胞の存在が明らかにされており、これらの細胞の水晶体形成への関与が示唆されている (Bancroft and Bellairs, 1977)。これらの知見から、単純に水晶体プラコードの陥入だけでは水晶体形成過程を説明できず、他の組織もまたその形成に関与している可能性が考えられた。この可能性について検討するため、ステージ 9~11 胚の頭部外胚葉の様々な領域に硝子キャピラリーを用いて DiI を付着させ (図 32Aa-f) 24 時間培養後、DiI 陽性細胞の位置を調べた (図 32Aa'-f)。水晶体プラコードを標識した場合 (図 32Ac, d)、DiI は予想通り水晶体で検出された (図 32Ac', d')。頭部外胚葉の後頭部や水晶体プラコードより背側の領域を標識した場合 (図 32Aa, b)、DiI は何れも水晶体内で検出されなかった (図 32Aa', b')。一方、腹側表皮外胚葉を標識した場合 (図 32Ae, f)、水晶体において DiI が検出された (図 32Ae', f')。また、腹側の位置によって将来の水晶体のどの部分を形成するかは異なっていた (図 32Ad''-f'')。このことから、水晶体は水晶体プラコードのみならず、頭部腹側外胚葉細胞の一部によっても構成されていることが判明した。また、腹側の頭部外胚葉が水晶体を形成する事実から、水晶体プラコードの陥入の際、腹側外胚葉細胞の移動がその原動力の一つになっている可能性が示唆された。

## 第四章 考察

### 第一節 $\delta$ -クリスタリンの発現制御機構について

#### 1. 水晶体形成過程における L-Maf と Sox2 の役割

ニワトリ頭部外胚葉において L-Maf と Sox2 を強制発現させた場合、L-Maf 単独の場合と比較して、より広域で  $\delta$ -クリスタリンを誘導した (図 10E')。さらに、L-Maf は内在性の Sox2 が発現している領域でのみ  $\delta$ -クリスタリンを誘導することが示された (図 15)。これらの結果から、L-Maf による  $\delta$ -クリスタリンの発現誘導には Sox2 が必要であることが示唆された。水晶体プラコード陥入途中の L-Maf および  $\delta$ -クリスタリンの発現を詳細に観察すると、 $\delta$ -クリスタリンの発現は、L-Maf が発現していた領域の一部、将来水晶体繊維に分化する領域に限局していた (浦野、2001 年度 奈良先端大 修士論文)。この事実からも、 $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導しているのは L-Maf のみではないことを示唆しており、Sox2 との関与が予想される。

興味深いことに、L-Maf と Sox2 を強制発現させた頭部外胚葉でみられた  $\delta$ -クリスタリン陽性細胞は水晶体繊維細胞に類似した伸長した形態を示していた (図 10E')。Sox1 および *c-maf* のノックアウトマウスでは、それぞれクリスタリン遺伝子の発現の減少および喪失、水晶体細胞の繊維化の阻害が観察されている (Nishiguchi et al., 1998; Kawauchi et al., 1999)。また、L-Maf の強制発現により、培養網膜細胞を水晶体細胞に分化させる (Ogino and Yasuda, 1998)。これらの報告も合わせると、L-Maf と Sox2 の協調作用が水晶体分化にも関わっていることが示唆される。

個体において L-Maf は水晶体形成に必須であり (Reza et al., 2002)、Sox2 もまた Pax6 と共に水晶体プラコードを誘導する (Kamachi et al., 2001)。さらに、眼胞を裏打ちする頭部外胚葉において、L-Maf の発現が検出される時期以前より Sox2 の発現が増強されること (Furuta and Hogan, 1998; Kamachi et al., 1998) が明らかにされている。これらの事実より、水晶体の誘導過程においても L-Maf と Sox2 が協調的に作用していることが推測される。

L-Maf と Sox2 が水晶体の形態形成に関わることを支持する別の要因として、細胞間接着因子である N-cadherin との関わりがある。培養系において、L-Maf が  $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導できるのは N-cadherin 発現細胞のみであることが示されている (Aya and Yasuda, 1999 実験医学 Vol. 17 No. 3 113-117)。一方、Sox2 と N-cadherin mRNA の発現パターンは相同であり、且つ個体における強制発現で Sox2 は単独で N-cadherin の発現を誘導することが明らかにされている (大阪大学 近藤研究室 松股美穂さん 未発表データ)。これらの結果を統合すると、L-Maf により  $\delta$ -クリスタリンを発現誘導できるのは Sox2 陽性細胞であることになり、著者が得たデータと矛盾しない。また、DiI による頭部外胚葉のマッピング (図 32C) との比較から、L-Maf の強制発現後の  $\delta$ -クリスタリン陽性細胞の移動は野生型の細胞と同様であることが判明した。よって、L-Maf は細胞の移動には少なくとも直接には関与しないことが予



想される。これは、個体においては外来性 L-Maf による N-cadherin の発現誘導がみられなかった結果（データ示さず）と矛盾しない。しかし、L-Maf は水晶体誘導に必須の因子であることから (Reza et al., 2002)、移動中の水晶体細胞における N-cadherin の発現誘導に、Sox2 と相互作用することによって二次的に関わっていることが予想される。

一方、眼形成のマスター制御因子 Pax6 は水晶体の形態形成においても重要な役割を果たすと考えられる。Pax6 +/- のキメラ水晶体上皮細胞は、未分化なまま後方に移動する (Collinson et al., 2000)。また、Pax6 は水晶体において細胞接着因子である  $\alpha 5\beta 1$ -インテグリンの発現を制御している (Duncan et al., 2000)。これらのことから、Pax6 は水晶体細胞の移動をも制御していることが示唆される。しかし、N-cadherin の発現には影響しないことから（データ示さず）、水晶体細胞の移動における Pax6 の役割は L-Maf や Sox2 と異なることが予想される。

## 2. L-Maf と Sox2 による協調効果

個体で  $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現開始時間を追った実験で、L-Maf と Sox2 の共発現を行った場合、L-Maf 単独を導入した場合（厳密には内在性の Sox2 と協調した場合）と比較して、 $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現が早く検出された（図 16）。個体におけるこの結果は、実際の水晶体形成過程で L-Maf による  $\delta$ -クリスタリンの転写活性化を Sox2 が増強していることを強く裏付けるものである。さらに、今回の *in ovo* レポーターアッセイで L-Maf と Sox2 の協調作用が  $\delta$ -クリスタリンエンハンサーを介して行われることが判明した。ここで用いたエンハンサー配列 BHd は  $\delta$ -クリスタリンエンハンサー上にある Maf 配列（四個、そのうち Maf の結合が確認されているのは MafU と MafD）と Sox2 結合配列三個（SoxU、SoxM および SoxD）を含んでおり、水晶体特異的なレポーター活性を示す（図 18A'）。一方、これまでに報告されていた BHd より短く、水晶体特異的なエンハンサー配列とされていた HN（DC5）領域 (Hayashi et al., 1987, 一部の L-Maf、Sox2 及び Pax6 結合配列含む) を用いて同様のアッセイを行ったところ、その転写活性は弱かった（図 19A'）。また、Sox2 と Pax6 による協調作用は、培養系を用いた結果 (Kamachi et al., 2001) と同様に見られたが（図 19E'）、L-Maf と Sox2 の場合ではみられなかった（図 19D'）。この結果から、実際の個体における  $\delta$ -クリスタリンの水晶体特異的な発現、および L-Maf と Sox2 による協調作用を実現するには、少なくとも HN 領域より長い配列が必要であることが示唆された。BHd 内には HN のより下流に位置する MafD 配列を含んでおり、v-Maf が強く結合する (Muta et al., 2002)。このことから、L-Maf が MafD を介することで Sox2 との協調作用を実現していることが予想される。

また同レポーターアッセイにおいて、L-Maf は単独で L-Maf 結合配列  $\alpha$ CE2 および BHd を介してレポーター遺伝子の転写を活性化した。一方、L-Maf は Sox2 が存在する場合のみ  $\delta$ -クリスタリンを誘導した。このことから、実際の  $\delta$ -クリスタリンの発現誘導には L-Maf による転写活性化能のみでは不十分であり、Sox2 によるサポートが必要であることが考えられる。では、Sox2 はエンハンサー上でどのように L-

Maf をサポートし、転写活性化を増強しているのか。

Sox ファミリーは、転写活性化ドメインを持っているが、自身の DNA 結合能が低く ( $K_d=10^{-8} \sim 10^{-9}$  M *in vitro*)、細胞特異的で DNA に結合可能なパートナーファクターの存在によって初めて標的遺伝子を転写活性化することが報告されている (Kamachi et al., 1995; Yuan et al., 1995; Lefebvre et al., 1997; De Santa Barbara et al., 1998; Kamachi et al., 1999; Nishimoto et al., 1999)。一方、L-Maf は水晶体特異的に発現し、ゲルモービリティシフトアッセイにより、単量体でも標的配列に結合可能であることが明らかとなっている (2000 年度 大雲 奈良先端大 修士論文)。よって、L-Maf が Sox2 のパートナーとしての条件に適っているといえる。

Sox2 はまた、パートナーと直接結合することが明らかになっている。FGF4 や UTF1 のプロモーター上で Sox2 と共に働く Oct-3/4 には、Sox2 と相互作用することで初めて転写活性化を引き起こせるドメインが存在している (Ambrosetti et al., 1997; Nishimoto et al., 1999; Ambrosetti et al., 2000)。Pax6 もまた Sox2 と DC5 配列上で直接結合し、その三者の複合体形成がエンハンサー活性の相乗効果に必要であることが報告されている (Kamachi et al., 2001)。一方、L-Maf の転写活性化領域とヒンジ領域 (AH 領域) を c-Maf のそれに置換すると、L-Maf 本来の  $\delta$ -クリスタリンの誘導活性がみられなくなることから、このドメインが  $\delta$ -クリスタリンの誘導活性に重要であると考えられている (Yoshida and Yasuda, 2002)。よって Sox2 がこのドメインに直接相互作用することで、 $\delta$ -クリスタリンの誘導を実現している可能性が考えられた。しかし、実際に AH ドメインを欠失したものや VP16 に置換した変異型 L-Maf を Sox2 と共に個体に導入すると、野生型 L-Maf を用いた場合と同様、 $\delta$ -クリスタリンが強く誘導された (図 20F, G)。このことから、他にも報告があるように (Ambrosetti et al., 2000) DNA 結合ドメインである b-Zip が Sox2 との相互作用に用いられているのかもしれない。

その他、Sox2 は DNA を折り曲げることで他の転写のマシーナリーをリクルートする活性を持っている (Connor et al., 1994; Lefebvre et al., 1997; Kamachi et al., 1999; Scaffidi and Bianchi, 2001; Weiss, 2001)。この Sox2 の作用により、L-Maf が  $\delta$ -クリスタリンエンハンサー上の自身の結合配列へ接近することが容易になり、その結果として  $\delta$ -クリスタリンの転写活性化を引き起こしている可能性も考えられる。

### 3. $\delta$ -クリスタリンの発現制御における L-Maf、Sox2 および Pax6 三者の関係

Maf、Sox2 および Pax6 三者が  $\delta$ -クリスタリンの発現に必要であることが、これらの結合配列に塩基置換を導入したトランスジェニックマウスを用いた解析から明らかにされている。Maf は水晶体繊維においてのみ活性を持つ、Pax6 は異なる結合配列を介することで活性型および抑制型の両方の機能を使い分ける、Sox2 は水晶体発生過程に一貫して必要とされる、といった  $\delta$ -クリスタリンの発現制御を担うこれらの個々の機能が示された (Muta et al., 2002)。しかし、これらの結果は、水晶体が分化する段階で得られたものであり、水晶体の誘導過程、つまり  $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導されるとき機構を説明するものではない。その例として、このマウスを用い

たレポーターアッセイでは、その活性は将来の水晶体繊維でのみ検出されたが (Muta et al., 2002)、ニワトリの場合では将来の水晶体上皮においても確認されており (図 18A'), 内在性の  $\delta$ -クリスタリンの発現をより正確に再現している。

また、これまで L-Maf と Sox2 との関係は明らかでなかったが、今回の我々の gain-of-function の結果がそれを初めて直接的に証明したと述べている。L-Maf と Sox2 による  $\delta$ -クリスタリン誘導能は (図 10E') Pax6 と Sox2 による場合 (図 22D') と比較して著しく高かった。また、正常の発生段階で Sox2 と Pax6 が発現した直後では、 $\delta$ -クリスタリンの発現はみられず、L-Maf が誘導された後で初めて検出されており、その発現領域も L-Maf の発現領域内に限られている (Ogino and Yasuda, 1998)。これらのことより、L-Maf が  $\delta$ -クリスタリン発現誘導のトリガーであることが予想される。

一方で、Pax6 と Sox2 による協調効果が当レポーターアッセイにおいても確認されたが (図 18E', 19E'), これは過去の報告、培養系で Pax6 と Sox2 が水晶体特異的エンハンサー DC5 上で協調効果を示している結果 (kamachi et al., 2001) と一致している。さらに、これら両結合サイトに塩基置換を導入したトランスジェニックマウスにおいてレポーター活性が全く検出されなかったことから (Muta et al., 2002)、水晶体における  $\delta$ -クリスタリンのエンハンサー活性にこれらの作用も重要であると考えられる。

L-Maf と Pax6 を頭部外胚葉に共発現した場合の  $\delta$ -クリスタリンの発現誘導は、L-Maf 単独を導入した場合と変化はみられなかった (図 10A')。Pax6 は、Nrl-Maf と共にマウス  $\delta$ -クリスタリンの発現を制御することや (Sharon-Friling et al., 1998)、Maf と協調的にグルカゴンプロモーターを活性化すること (Planque et al., 2001) が最近報告されている。しかし一方で、Pax6 が Maf による DNA への結合を阻害すること (Kataoka et al., 2001)、および Pax6 が  $\delta$ -クリスタリンエンハンサー上で活性型、不活性型両方の作用を持つこと (Muta et al., 2002) も明らかにされている。よって、我々の得た結果は、これら Pax6 の複雑な作用機構を反映したものであると予想される。

#### 4. $\delta$ -クリスタリンの発現誘導機構は他の水晶体特異的因子とは異なる。

頭部外胚葉において、L-Maf の強制発現により誘導された他の水晶体分化マーカー  $\alpha$ A-クリスタリン、フィレンシンおよび CP49 の発現は  $\delta$ -クリスタリンとは異なり、頭部外胚葉全域で検出された (図 6)。 $\delta$ -クリスタリンの発現の領域特異性が Sox2 の発現に依存したものであれば、少なくとも前者 3 つの因子はその発現誘導に Sox2 を必要としないことが推測される。マウスフィレンシンの上流には L-Maf 結合配列である  $\alpha$ CE2 と Sox2 結合サイトが存在することが報告されている (Masaki et al., 1998)。このことから、フィレンシンは L-Maf の直接のターゲット因子であることが推測される。またこの時、Sox2 は L-Maf と協調してフィレンシンの発現を制御するとしても、 $\delta$ -クリスタリンの発現誘導の場合とは異なり、転写を増強する効果しか示さないことが予想される。発現誘導において  $\delta$ -クリスタリンのみが L-Maf と Sox2 の両者を必要とする理由については、 $\delta$ -クリスタリンが水晶体誘導過程の初期から発現

すること (Piatigorsky, 1981)と、水晶体が誘導される直前に眼胞に裏打ちされる表皮外胚葉で Sox2 の発現が増強される事実 (Furuta and Hogan, 1998; Kamachi et al., 1998) から説明できるかもしれない。

フィレンシン、CP49 および  $\alpha$ A-クリスタリンの三者の産物は、水晶体繊維細胞において物理的に相互作用していることが報告されている (FitzGerald and Graham, 1991; Carter et al., 1995)。よって、これらが同一細胞、および領域で発現することが考えられ、L-Maf 以外にも多くの上流因子を共有していることが予想される。

## 5. 新規の水晶体形成の分子モデル

今回得た結果とこれまでの知見を統合すると、 $\delta$ -クリスタリンの発現誘導の分子モデルを以下のように提起できる (図 21)。水晶体プラコードが形成される時期以前より Pax6、それに続いて Sox2 が頭部表皮外胚葉の広い領域において発現し (Grindley et al., 1995; Kamachi et al., 1998)、将来水晶体を形成する大まかな領域を与える (水晶体分化コンピテンス)。実際、これらの因子を個体に強制発現させると異所的な水晶体プラコード、および  $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導する (Kamachi et al., 2001)。だが、これらは水晶体特異的な発現パターンを示さないため、次なる水晶体プラコードの誘導には、下流にあって、おそらく眼胞からの誘導シグナルに応答する水晶体特異的な因子が必要となる (水晶体スペシフィケーション)。事実、Sox2 と Pax6 の強制発現により、水晶体特異的な転写因子 L-Maf が誘導されることが明らかになっている (Reza et al., 2002)。ドミナントネガティブ型 L-Maf の強制発現により、水晶体形成が全く起らなくなる (Reza et al., 2002)ことから、L-Maf は水晶体の誘導に必須の因子であると考えられる。今回の我々の実験により、L-Maf は  $\delta$ -クリスタリンの発現誘導、おそらくは水晶体形成を Sox2 に依存して行うことを明らかにした。また、この過程で Sox2 は、水晶体コンピテンスを確立する段階とは異なった機能を持つと推測できる。L-Maf と Prox1 の共発現では、頭部外胚葉の様々な領域で  $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導されたが (図 10C, C'), その発現は L-Maf と Sox2 を共発現した場合 (図 10E, E') と比較して弱かった。このことから  $\delta$ -クリスタリンの発現制御のメジャープレイヤーは L-Maf と Sox2 であり、Prox1 自身は L-Maf との協調作用には必要でなく、水晶体分化過程においては独立した機能を持つことが考えられる。例えば、報告されているような水晶体繊維細胞の極性化、最終分化の遂行への関与が挙げられる (Wigle et al., 1999; Reza et al., 2002)。

今回、L-Maf が Sox2 と協調することで  $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導するという新しいモデルが、これまでのモデル (Reza et al., 2002)に付け加わることになる。L-Maf、Sox2 および Pax6 の三者はそれぞれ固有の機能を持つ一方で、共に  $\delta$ -クリスタリンの発現を制御している。その中で、互いの相互作用が不明であった L-Maf と Sox2 が、 $\delta$ -クリスタリンエンハンサー上で協調することでその発現誘導および転写活性化を実現していることが明らかとなった。これら水晶体形成に関わる因子の相互作用のさらなる解析が、水晶体発生の全容をより明らかにしていくものと期待される。

## 6. $\delta$ -クリスタリンの発現を制御しうる他の因子

Maf ファミリーの遺伝子群が水晶体形成に関与していることは、様々な脊椎動物において明らかにされている (Sakai et al., 1997; Moens et al., 1998; Ogino and Yasuda, 1998; Kawauchi et al., 1999; Kim et al., 1999; Ishibashi and Yasuda, 2001; Kajihara et al., 2001; Muta et al., 2002; Reza et al., 2002)。マウスにおいては、水晶体で MafB や c-Maf が発現しており、水晶体の発生や下流クリスタリン遺伝子群の発現に関与していることが報告されている (Kim et al., 1999; Kawauchi et al., 1999)。マウス *c-maf* のホモザイゴートはすべてのクリスタリン遺伝子群の発現を減少させる (Kawauchi et al., 1999)。ニワトリにおいては、 $\alpha$ A-クリスタリン上流の水晶体特異的なエンハンサー配列  $\alpha$ CE2 に L-Maf のみでなく、c-Maf や MafB が結合してレポーター遺伝子の転写を活性化すること (Ogino and Yasuda, 1998)、および内在性の  $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導する (Yoshida and Yasuda, 2002)ことが報告されている。これらのことより、L-Maf が他の Maf とヘテロダイマーを形成することで  $\delta$ -クリスタリンの発現を制御している可能性が考えられる。実際に Maf ファミリー間でのヘテロダイマーの組み合わせにより、転写活性化能が変化する (Kataoka et al., 1996)。c-Maf や MafB は L-Maf より発現時期が遅く、水晶体分化初期では検出されないことから (Ogino and Yasuda, 1996)、水晶体分化後期の  $\delta$ -クリスタリンの発現維持に関与していることが推測される。

Sox2 の他に水晶体で発現する Sox ファミリー因子として、Sox1、3、21 がある (Kamachi et al., 1998; Uchikawa et al., 1999)。Sox1 および 3 の発現は Sox2 に続いて誘導され、発現領域も Sox2 と類似している。またいずれも  $\delta$ -クリスタリン第三イントロン上の水晶体特異的なエンハンサー DC5 を活性化することができる (Kamachi et al., 1998)。Sox1 欠損マウスでは、Sox2 および Sox3 が発現していない時期でのみ  $\gamma$ -クリスタリンの発現がみられなくなる (Nishiguchi et al., 1998)ことから、Sox1-3 がその機能に重複性を持っていると考えられる。よって、Sox1、3 は  $\delta$ -クリスタリンの発現制御における L-Maf との協調作用に関して、Sox2 と同様の機能を持つことが予想される。

一方 Sox21 は、Sox1、2 による DC5 エンハンサーの活性化を抑制する。また、その発現は Sox2、3 と同様の時期より水晶体上皮において検出される (Uchikawa et al., 1999)。このことから実際の  $\delta$ -クリスタリンの発現制御において Sox 21 は、Sox1-3 と競合して Sox 結合サイトを奪い合うことで  $\delta$ -クリスタリンの発現量を調節していることが考えられる。これが事実であれば、L-Maf の転写活性化作用を Sox 21 が負に制御していることが予想される。

他に、基本転写因子と普遍転写因子の仲介役として機能する転写メディエーターが  $\delta$ -クリスタリンの発現制御に働く可能性も否定できない。 $\delta$ -クリスタリン遺伝子は、転写に先だって脱メチル化を起こしているという報告 (Grainger et al., 1983) もある。よって、その発現制御の際に DNA のクロマチン構造を変化させる因子もまた L-Maf と相互に何らかの作用を及ぼし合っているのかもしれない。

## 第二節 個体における $\alpha$ CE1 および cCP2 の機能について

CP2 /NF2d9 ファミリーは様々な遺伝子の組織特異的な発現制御に働くことが知られている転写因子群である (Lim et al., 1992; Jane et al., 1995; Sueyoshi et al., 1995)。ニワトリ cCP2 は  $\alpha$ A-クリスタリン遺伝子上流の水晶体特異的なエンハンサー配列  $\alpha$ CE1 に結合する因子として同定された (Murata et al., 1998)。水晶体細胞において cCP2 は  $\alpha$ CE1 を介してレポーター遺伝子の転写活性を誘導する。その際、cCP2 は  $\alpha$ A-クリスタリン遺伝子上にあるもう一つのエンハンサー配列  $\alpha$ CE2 に結合する L-Maf と共に協調的な転写活性化作用を示すことが明らかにされている (村田 1998 年度 奈良先端大 博士論文)。個体における  $\alpha$ CE1 および cCP2 の機能は不明であったが、今回その一部を明らかにした。

### 1. $\alpha$ A-クリスタリンの発現制御における cCP2 の分子機序

個体において cCP2 と L-Maf が互いの配列を介した協調作用を示す可能性について検討するため、 $\alpha$ CE1、 $\alpha$ CE2 を含む  $\alpha$ A-クリスタリンの上流配列  $\alpha$ 244 を配した lacZ 遺伝子を L-Maf、cCP2 と共に頭部外胚葉の水晶体領域付近に導入した。その結果、L-Maf および cCP2 単独と共導入した場合と比較して、レポーター活性が増加していた (図 24)。従って、個体においても両者が協調的に  $\alpha$ A-クリスタリンの転写を促進することが判明した。しかしながら、 $\alpha$ CE1 配列を lacZ 遺伝子に連結したものをレポーターとして用いた場合、cCP2 によるレポーター活性は水晶体では検出されず、周囲の頭部外胚葉でのみ観察された (図 25)。 $\alpha$ CE2 を配した lacZ 遺伝子をレポーターとして L-Maf、cCP2 と共に水晶体領域付近に導入した場合も同様に、水晶体内でのみレポーター活性が検出されなかった (図 26B', C')。この cCP2 による水晶体特異的な転写抑制は、培養系を用いた結果 (Murata et al., 1998) と矛盾しており解釈が困難であるが、水晶体特異性をキーワードにこの結果についての考察を試みる。 $\alpha$ CE1 は cCP2 結合配列と 3'側の LSE (Lens Specific Element) という水晶体特異性を決定する配列との二つのモチーフ構造をとり、 $\alpha$ CE1 のエンハンサー活性には両者が必要であることが明らかにされている (Murata et al., 1998)。また  $\alpha$ CE2 の共存下では LSE 単独でもそのエンハンサー活性を発揮できることが報告されている (Matuo and Yasuda, 1992)。これらのことより、LSE が  $\alpha$ CE1、2 を介した cCP2 と L-Maf の協調作用に何らかの役割を果たしていることが示唆される。とすれば、LSE が正常に機能するために  $\alpha$ CE2 が必要であり、 $\alpha$ CE2 が存在しない条件下では LSE が cCP2 に水晶体特異的な抑制効果を付加してしまうのかもしれない。また、LSE 結合因子が cCP2 と直接相互作用できるのであれば、cCP2 が L-Maf による  $\alpha$ CE2 を介した転写活性化を水晶体特異的に阻害した (図 26B', C') のは、LSE 結合因子が結合する基盤を得られなかったためとの解釈が可能である。これらのことを確かめるには、LSE 配列に変異を導入して同様の in ovo レポーターアッセイを行うことや LSE 結合因子を同定することなどが必要であろう。

## 2. cCP2 による $\delta$ -クリスタリンの発現の抑制機構

cCP2 の水晶体形成における機能を明らかにする目的で、cCP2 を単独、若しくは L-Maf と共に個体に導入して水晶体初期分化マーカーである  $\delta$ -クリスタリンの発現に与える影響を解析した。cCP2、および VP16-cCP2 を頭部外胚葉の水晶体領域付近に強制発現したところ、後者を用いた場合では 内在性  $\delta$ -クリスタリンの発現の抑制が観察された (図 27Aa', Ca')。一方、cCP2 や VP16-cCP2 を L-Maf と共に強制発現させた場合、異所的な  $\delta$ -クリスタリンの発現は水晶体から離れた頭部外胚葉で大幅に抑制されていた (図 27Ab', Cb', c')。この抑制作用が観察された領域が特異的であったことの説明の一つとして、水晶体付近では Sox2 の発現量が多いため、cCP2 が L-Maf と Sox2 による強力な  $\delta$ -クリスタリンの誘導を完全には抑制しきれなかったことが考えられる。別の説明としては、水晶体以外の組織を水晶体分化に向かわせないための cCP2 による積極的な抑制機構が働いたことが考えられる。cCP2 はユビキタスに発現しているため (図 4C)、実際の水晶体の発現制御においても同様の機構が働いている可能性が考えられる。

では、その抑制作用はどのような分子機構によるものなのか。cCP2 による  $\delta$ -クリスタリンの発現に対する抑制作用はドミナントネガティブ型の  $\Delta$ DBD-cCP2 および En-cCP2 においても観察された (図 27Bb', 29B)。従って、cCP2 自身の DNA 結合能、および転写活性化能はその抑制作用には関与しないことが示唆される。だとすれば、cCP2 の残りの機能ドメインである相互作用ドメイン (福司 奈良先端大 修士論文) が抑制効果をもたらしていることが予想される。cCP2 は  $\alpha$ CE1 に結合する四量体  $\alpha$ CEF1 のサブユニットの一つであり (Murata et al., 1998)、サブユニット間の相互作用に、N 末端側および C 末端付近に存在するこのドメインが作用していると考えられる。マウスの発生の初期から腎臓で強く発現する CP2-Related Transcriptional Repressor-1 (CRTR-1) の N 末端もまた転写抑制作用を持つことが報告されている (Rodda et al., 2001)。 $\alpha$ CEF1 のもう一つのサブユニットとして cNF2d9 が同定されているが (村田 1998 年度 奈良先端大 博士論文)、cNF2d9 の転写活性化能は cCP2 のそれより低く、また、著者の行った個体における cNF2d9 強制発現実験では  $\delta$ -クリスタリンの発現に影響を及ぼさないことが観察されている (図 31)。これらの結果は cNF2d9 が cCP2 とは異なる性質を持つことを示すものである。よって、cCP2 が抑制作用を示した結果は、cCP2 のみで四量体を形成したことにより正常の  $\alpha$ CEF1 と異なる作用を示したことに起因しているのかもしれない。また、cCP2 が翻訳後修飾 (おそらくは Erk1 によるリン酸化) を受けていることが予想されることから (Volker et al., 1997; Murata et al., 1998)、cCP2 による抑制作用と修飾がリンクしている可能性が考えられる。

最も肝心の、cCP2 により直接抑制を受けるターゲットの候補としては L-Maf が挙げられる。これは、 $\alpha$ CE2 を用いた *in ovo* レポーターアッセイの結果 (図 26) や L-Maf との共導入により  $\delta$ -クリスタリンの発現が転写レベルで抑制されること (図 28) などから推定される。cCP2 と L-Maf が直接的に相互作用しているかを検討するため 293T 細胞において mammalian two hybrid を一回のみ施行したが、両者が結合

する可能性を示唆する有為な結果が得られなかった(データ示さず)。しかし、これはあくまでも想像に過ぎず、cCP2 による L-Maf の抑制機構の可能性を検討するにはタンパク質レベルでのより詳細な機能解析が必要となるであろう。

### 3. 水晶体分子カスケードにおける cCP2 の位置付け

頭部外胚葉における L-Maf の強制発現実験で、頭部の全域において  $\alpha$ A-クリスタリンの発現を誘導できたが(図6)、 $\delta$ -クリスタリンの場合は全域での発現に Sox2 を必要とした(図10E')。よって、L-Maf は  $\alpha$ A-クリスタリンと  $\delta$ -クリスタリンに対して、それぞれ異なった制御をしていると予想される。一方、cCP2 は個体においても L-Maf との協調的な  $\alpha$ A-クリスタリンの発現誘導に関わっていることが予想されるが、逆に水晶体の陥入や  $\delta$ -クリスタリンの異所的な発現を抑制した(図27)。このことから、cCP2 はその転写活性化能と抑制作用を使い分けることで、水晶体の形成、および標的遺伝子の発現を制御しているのであろう。実際の  $\alpha$ A-クリスタリンの発現は水晶体細胞の繊維化の開始と同時に検出されることから、cCP2 は水晶体の後期分化を促進し、初期分化に対してさらに分化を進めるように(表現型は抑制的)に作用するのかもしれない。

$\alpha$ A-クリスタリンの発現が開始するのは cCP2 および L-Maf が発現する時期よりさらに遅いステージであることから、その発現誘導には cCP2 や L-Maf 以外の他の因子もまた必要であることが予想される。 $\alpha$ A-クリスタリンの発現誘導のトリガーの候補として bZip を有する ATF-4 (CREB2)が挙げられる。ATF-4 は LSE 配列に結合可能である(村田氏 1998 年度 博士論文)。また、ノックアウトマウスの解析により ATF-4 は水晶体の繊維化に関与することが明らかになっている(Tanaka et al., 1998; Hettmann et al., 2000)。

cCP2 の強制発現により Pax6 の発現を誘導した(図30A)。しかしその発現は弱く、cCP2 による直接的な発現誘導というよりはむしろ二次的な影響によるものであると予想される。Pax6 は水晶体形成の最も上位に位置する因子であることから(Quiring et al., 1994; Halder et al., 1995)、cCP2 が水晶体形成の全体の制御にも関与している可能性が考えられる。

いずれにせよ、水晶体形成過程における cCP2 の分子機序の解明には、個体レベルで  $\alpha$ A-クリスタリンの発現制御機構を詳細に調べるのが近道となる。

ここまですら概説すると、cCP2 は L-Maf と協調して  $\alpha$ A-クリスタリンの発現を制御するだけでなく、水晶体の陥入、および  $\delta$ -クリスタリンの発現を抑制する作用も有していることから、その機能は複雑かつ巧妙であることが予想される。また、水晶体の発生過程において cCP2 は水晶体をより後期の分化に向かわす役割をしていることが推測される。しかしながら、 $\alpha$ A-クリスタリンの発現、および水晶体形成における cCP2 の作用機構はまだ不明な点が多い。今後 cCP2 と他の因子との遺伝学的な相互作用、および構造解析を含めた cCP2 の生化学的な解析が cCP2 の複雑な作用機構をより明らかなものにしてくれると期待される。



### 第三節 水晶体の運命決定機構について

過去に作成されたニワトリ運命予定図において、水晶体予定領域はステージ 4 ですでに神経板の近傍に存在しており (Rudnick, 1944)、ステージ 9 では神経管の眼胞に接した外胚葉上で円状に存在していること (Webb and Noden 1993) が報告されていた。しかし、今回のマッピングの結果から (図 32)、将来水晶体になる領域はより腹側の外胚葉にまで広がっていることが判明した。この水晶体になる領域が広範囲である結果を指示できるデータは、すでに Bancroft らにより報告されている (Bancroft and Bellairs, 1977)。彼女らは、水晶体プラコードが陥入する過程は鼻プラコードや耳プラコードのそれと非常に類似していると主張しており、例えば、陥入する細胞の形状 (分厚く丸い、小さいマイクロチューブルやマイクロフィラメントが発達している) や背腹軸での陥入の仕方の非対称性などを電顕による観察から明らかにしている。特筆すべきことに、水晶体の陥入途中では、水晶体プラコードから腹側にかけて陥入途中の細胞と同様な形状の細胞集団が帯状に観察されている。これらの細胞は水晶体の陥入がほぼ終了したステージ 18 の胚において消失しており、水晶体プラコードへ加わるために移動している細胞であると予想している。実際に水晶体プラコードより腹側の頭部外胚葉に DiI ラベルした胚を凍結切片にすると、DiI 陽性細胞が水晶体繊維細胞にまで移動していることを確認した (図 32Ae', f')。将来水晶体になる細胞は眼胞に裏打ちされて肥厚した水晶体プラコードのみでなく、腹側のより広い領域にも存在することは、つまり水晶体になる領域は、眼胞からの誘導シグナルにおそらくは直接さらされない領域をも含むことを示している。このことは、これまでのコンピテンスおよびプラコードの定義を覆しかねない大変重要な発見であり、細胞運命の新規の決定機構の解明に繋がるかもしれない。

## 謝辞

本研究を勧めていくにあたり、御指導、御鞭撻下さいました本学バイオサイエンス研究科教授 安田國雄先生を始め、スタッフの方々や学生の皆様に深く感謝の意を表すとともに、この場をお借りして、御礼の言葉を申し上げたいと思います。安田先生には、五年間本当にお世話になりました。研究室に入りたてで未熟であった私もここまで成長(?)できたのも一重に先生の御指導(と放任主義)あってこそだと思っております。常に真理を追究される先生の志は研究者としてのあり方のよい指針となりました。CDB チームリーダー(前助教授)高橋淑子先生には、プレゼンテーションの指導をいただいたばかりか、今後有益となるであろう研究上での様々な機会を設けて下さいました。そして何より、女性研究者である先生の存在は、今後この業界で生きていく(?)私に希望を与えて下さいました。本学同助手の井上邦夫先生には、笑いのネタにしかならない私に対して、研究上の適切かつ鋭いアドバイスをいただきました。同じく助手の影山裕二先生には、ディスカッションからカラオケまで本当にお世話になりました。ポスドク Hasan Mahmud Reza 博士には、投稿論文の英語を丁寧にチェックしていただきました。

共同研究者である大阪大学、生体機能研究科の近藤寿人教授には、 $\delta$ -クリスタリンエンハンサーや Sox の各コンストラクトを提供して下さるとともに、研究において大変有益なディスカッションをしていただきました。また、熊本大学学長 江口吾郎博士には  $\delta$ -クリスタリン抗体産生ハイブリドーマを提供して下さいました。

実験をするに当たり、研究室の多くの人の世話になりました。前助手 荻野肇博士にはウエスタンブロット法、MBP 融合タンパク質の作製および精製法、吉田知則博士には細胞免疫染色法、コンストラクション、前川真吾博士には His 融合タンパク質の精製法、綾村田友子さんには、エレクトロポレーション法、ハイブリドーマの培養法、ホールマウント抗体染色法、鈴木仁博士にはノーザンブロット法、阪上紀世さんには *in situ* ハイブリダイゼーション法、抗体作製法、越智陽城さんには細胞の培養法、ルックアッセイ法、佐藤有紀さんにはニューカルチャー法、神唯さんには抗体作製法、長谷川武弘さんにはルックアッセイ法、浦野充代さんには凍結切片法、切片抗体染色法、橋本祥子さんにはゼブラフィッシュの飼育法、石井章子さんには共焦点レーザー顕微鏡の御指導を賜りました。また、ラット全採血法の指導には、知人である本学物質創成科学研究科、生体適合性物質科学講座の斎藤充弘さんが快く引き受けて下さりました。

日常の研究活動を支えて下さった秘書の明楽さん、コンピューター係の内山さん、有り難うございました。

皆様と時には、笑い、落込み、怒り、そして酒を交わしたことは今にしては青春の一ページです。研究以外にも皆様から学んだことは多く、これからの私の人生の大きな糧になることだと思います。このような奇人を受入れて頂いたことに感謝します。

最後に、経済的、もしくは精神的な援助を賜った家族、親戚および友人の皆様に感謝の意を表したいと思います。

## 引用文献

Acampora, D., D'Esposito, M., Faiella, A., Pannese, M., Migliaccio, E., Morelli, F., Stornaiuolo, A., Nigro, V., Simeone, A., and Boncinelli, E. (1989). The human HOX gene family. *Nucleic Acids Res* *17*, 10385-402.

Ambrosetti, D. C., Basilico, C., and Dailey, L. (1997). Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol Cell Biol* *17*, 6321-9.

Ambrosetti, D. C., Scholer, H. R., Dailey, L., and Basilico, C. (2000). Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *J Biol Chem* *275*, 23387-97.

Bancroft, M., and Bellairs, R. (1977). Placodes of the chick embryo studied by SEM. *Anat Embryol (Berl)* *151*, 97-108.

Bruni, P., Minopoli, G., Brancaccio, T., Napolitano, M., Faraonio, R., Zambrano, N., Hansen, U., and Russo, T. (2002). Fe65, a ligand of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein, blocks cell cycle progression by down-regulating thymidylate synthase expression. *J Biol Chem* *277*, 35481-8.

Carter, J. M., Hutcheson, A. M., and Quinlan, R. A. (1995). In vitro studies on the assembly properties of the lens proteins CP49, CP115: coassembly with alpha-crystallin but not with vimentin. *Exp Eye Res* *60*, 181-92.

Cheyette, B. N., Green, P. J., Martin, K., Garren, H., Hartenstein, V., and Zipursky, S. L. (1994). The *Drosophila sine oculis* locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* *12*, 977-96.

Chow, R. L., Altmann, C. R., Lang, R. A., and Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* *126*, 4213-22.

Chow, R. L., and Lang, R. A. (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* *17*, 255-96.

Collinson, J. M., Hill, R. E., and West, J. D. (2000). Different roles for Pax6 in the optic vesicle

and facial epithelium mediate early morphogenesis of the murine eye. *Development* 127, 945-56.

Connor, F., Cary, P. D., Read, C. M., Preston, N. S., Driscoll, P. C., Denny, P., Crane-Robinson, C., and Ashworth, A. (1994). DNA binding and bending properties of the post-meiotically expressed Sry-related protein Sox-5. *Nucleic Acids Res* 22, 3339-46.

Cvekl, A., and Piatigorsky, J. (1996). Lens development and crystallin gene expression: many roles for Pax-6. *Bioessays* 18, 621-30.

Czerny, T., Halder, G., Kloter, U., Souabni, A., Gehring, W. J., and Busslinger, M. (1999). twin of eyeless, a second Pax-6 gene of Drosophila, acts upstream of eyeless in the control of eye development. *Mol Cell* 3, 297-307.

De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., and Berta, P. (1998). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18, 6653-65.

Duncan, M. K., Kozmik, Z., Cveklova, K., Piatigorsky, J., and Cvekl, A. (2000). Overexpression of PAX6(5a) in lens fiber cells results in cataract and upregulation of (alpha)5(beta)1 integrin expression. *J Cell Sci* 113, 3173-85.

Faber, S. C., Dimanlig, P., Makarenkova, H. P., Shirke, S., Ko, K., and Lang, R. A. (2001). Fgf receptor signaling plays a role in lens induction. *Development* 128, 4425-38.

FitzGerald, P. G., and Graham, D. (1991). Ultrastructural localization of alpha A-crystallin to the bovine lens fiber cell cytoskeleton. *Curr Eye Res* 10, 417-36.

Fujiwara, M., Uchida, T., Osumi-Yamashita, N., and Eto, K. (1994). Uchida rat (rSey): a new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse Sey mutant. *Differentiation* 57, 31-8.

Funahashi, J., Kamachi, Y., Goto, K., and Kondoh, H. (1991). Identification of nuclear factor delta EF1 and its binding site essential for lens-specific activity of the delta 1-crystallin enhancer. *Nucleic Acids Res* 19, 3543-7.

Furuta, Y., and Hogan, B. L. (1998). BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev* 12, 3764-75.

Goudreau, G., Petrou, P., Reneker, L. W., Graw, J., Loster, J., and Gruss, P. (2002). Mutually regulated expression of Pax6 and Six3 and its implications for the Pax6 haploinsufficient lens phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8719-24.

Grainger, R. M. (1992). Embryonic lens induction: shedding light on vertebrate tissue determination. *Trends Genet* 8, 349-55.

Grainger, R. M., Hazard-Leonards, R. M., Samaha, F., Hougan, L. M., Lesk, M. R., and Thomsen, G. H. (1983). Is hypomethylation linked to activation of delta-crystallin genes during lens development? *Nature* 306, 88-91.

Grindley, J. C., Davidson, D. R., and Hill, R. E. (1995). The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* 121, 1433-42.

Halder, G., Callaerts, P., and Gehring, W. J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267, 1788-92.

Hamburger, V. and Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49-92.

Harland, R., and Gerhart, J. (1997). Formation and function of Spemann's organizer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 611-67.

Hayashi, S., Goto, K., Okada, T. S., and Kondoh, H. (1987). Lens-specific enhancer in the third intron regulates expression of the chicken delta 1-crystallin gene. *Genes Dev* 1, 818-28.

Hettmann, T., Barton, K., and Leiden, J. M. (2000). Microphthalmia due to p53-mediated apoptosis of anterior lens epithelial cells in mice lacking the CREB-2 transcription factor. *Dev Biol* 222, 110-23.

Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B. L., Ton, C. C., Saunders, G. F., Hanson, I. M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. D., and van Heyningen, V. (1991). Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354, 522-5.

Horwitz, J. (1993). Proctor Lecture. The function of alpha-crystallin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 10-22.

Ishibashi, S., and Yasuda, K. (2001). Distinct roles of maf genes during *Xenopus* lens

development. *Mech Dev* 101, 155-66.

Jane, S. M., Nienhuis, A. W., and Cunningham, J. M. (1995). Hemoglobin switching in man and chicken is mediated by a heteromeric complex between the ubiquitous transcription factor CP2 and a developmentally specific protein. *Embo J* 14, 97-105.

Jean, D., Ewan, K., and Gruss, P. (1998). Molecular regulators involved in vertebrate eye development. *Mech Dev* 76, 3-18.

Kajihara, M., Kawauchi, S., Kobayashi, M., Ogino, H., Takahashi, S., and Yasuda, K. (2001). Isolation, characterization, and expression analysis of zebrafish large Mafs. *J Biochem (Tokyo)* 129, 139-46.

Kamachi, Y., Sockanathan, S., Liu, Q., Breitman, M., Lovell-Badge, R., and Kondoh, H. (1995). Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *Embo J* 14, 3510-9.

Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R., and Kondoh, H. (1998). Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* 125, 2521-32.

Kamachi, Y., Cheah, K. S., and Kondoh, H. (1999). Mechanism of regulatory target selection by the SOX high-mobility-group domain proteins as revealed by comparison of SOX1/2/3 and SOX9. *Mol Cell Biol* 19, 107-20.

Kamachi, Y., Uchikawa, M., and Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* 16, 182-7.

Kamachi, Y., Uchikawa, M., Tanouchi, A., Sekido, R., and Kondoh, H. (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev* 15, 1272-86.

Kataoka, K., Noda, M., and Nishizawa, M. (1996). Transactivation activity of Maf nuclear oncoprotein is modulated by Jun, Fos and small Maf proteins. *Oncogene* 12, 53-62.

Kataoka, K., Yoshitomo-Nakagawa, K., Shioda, S., and Nishizawa, M. (2001). A set of Hox proteins interact with the Maf oncoprotein to inhibit its DNA binding, transactivation, and transforming activities. *J Biol Chem* 276, 819-26.

Kawauchi, S., Takahashi, S., Nakajima, O., Ogino, H., Morita, M., Nishizawa, M., Yasuda, K.,

and Yamamoto, M. (1999). Regulation of lens fiber cell differentiation by transcription factor c-Maf. *J Biol Chem* 274, 19254-60.

Kim, J. I., Li, T., Ho, I. C., Grusby, M. J., and Glimcher, L. H. (1999). Requirement for the c-Maf transcription factor in crystallin gene regulation and lens development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3781-5.

Kobayashi, M., Nishikawa, K., Suzuki, T., and Yamamoto, M. (2001). The homeobox protein Six3 interacts with the Groucho corepressor and acts as a transcriptional repressor in eye and forebrain formation. *Dev Biol* 232, 315-26.

Kumar, J. P., and Moses, K. (2001). Eye specification in *Drosophila*: perspectives and implications. *Semin Cell Dev Biol* 12, 469-74.

Laudet, V., Stehelin, D., and Clevers, H. (1993). Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res* 21, 2493-501.

Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V. R., Goodfellow, P. N., and de Crombrughe, B. (1997). SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 17, 2336-46.

Lewis, W. H. Experimental studies on the development of the eye in Amphibia. I. On the origin of the lens, *Rana palustris*. (1904). *Amer. J. Anat* 3, 505-536.

Lim, L. C., Swendeman, S. L., and Sheffery, M. (1992). Molecular cloning of the alpha-globin transcription factor CP2. *Mol Cell Biol* 12, 828-35.

Lovicu, F. J., and Overbeek, P. A. (1998). Overlapping effects of different members of the FGF family on lens fiber differentiation in transgenic mice. *Development* 125, 3365-77.

Masaki, S., Kamachi, Y., Quinlan, R. A., Yonezawa, S., and Kondoh, H. (1998). Identification and functional analysis of the mouse lens filensin gene promoter. *Gene* 214, 77-86.

McGinnis, W., and Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.

McWhirter, J. R., Goulding, M., Weiner, J. A., Chun, J., and Murre, C. (1997). A novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A-Pbx1. *Development* 124, 3221-32.

Moens, C. B., Cordes, S. P., Giorgianni, M. W., Barsh, G. S., and Kimmel, C. B. (1998). Equivalence in the genetic control of hindbrain segmentation in fish and mouse. *Development* 125, 381-91.

Momose, T., Tonegawa, A., Takeuchi, J., Ogawa, H., Umesono, K., and Yasuda, K. (1999). Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ* 41, 335-44.

Motohashi, H., Shavit, J. A., Igarashi, K., Yamamoto, M., and Engel, J. D. (1997). The world according to Maf. *Nucleic Acids Res* 25, 2953-59.

Murata, T., Nitta, M., and Yasuda, K. (1998). Transcription factor CP2 is essential for lens-specific expression of the chicken alphaA-crystallin gene. *Genes Cells* 3, 443-57.

Muta, M., Kamachi, Y., Yoshimoto, A., Higashi, Y., and Kondoh, H. (2002). Distinct roles of SOX2, Pax6 and Maf transcription factors in the regulation of lens-specific delta1-crystallin enhancer. *Genes Cells* 7, 791-805.

Nicholl, I. D., and Quinlan, R. A. (1994). Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. *Embo J* 13, 945-53.

Nishiguchi, S., Wood, H., Kondoh, H., Lovell-Badge, R., and Episkopou, V. (1998). Sox1 directly regulates the gamma-crystallin genes and is essential for lens development in mice. *Genes Dev* 12, 776-81.

Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A., and Muramatsu, M. (1999). The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol* 19, 5453-65.

Ochi, H., Ogino, H., Kageyama, Y., and Yasuda, K. (2003). The Stability of the Lens-specific Maf Protein is Regulated by Fibroblast Growth Factor (FGF)/ERK Signaling in Lens Fiber Differentiation. *J Biol Chem* 278, 537-44.

Ogawa, H., Inouye, S., Tsuji, F. I., Yasuda, K., and Umesono, K. (1995). Localization, trafficking, and temperature-dependence of the Aequorea green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11899-903.

Ogino, H., and Yasuda, K. (1998). Induction of lens differentiation by activation of a bZIP



transcription factor, L-Maf. *Science* 280, 115-8.

Ogino, H., and Yasuda, K. (2000). Sequential activation of transcription factors in lens induction. *Dev Growth Differ* 42, 437-48.

Oliver, G., Loosli, F., Koster, R., Wittbrodt, J., and Gruss, P. (1996). Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene Six3. *Mech Dev* 60, 233-9.

Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Gruss, P. (1995). Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* 121, 4045-55.

O'Neill, E. M., Rebay, I., Tjian, R., and Rubin, G. M. (1994). The activities of two Ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* 78, 137-47.

Piatigorsky, J. (1981). Lens differentiation in vertebrates. A review of cellular and molecular features. *Differentiation* 19, 134-53.

Planque, N., Leconte, L., Coquelle, F. M., Benkhelifa, S., Martin, P., Felder-Schmittbuhl, M. P., and Saule, S. L. (2001). Interaction of Maf transcription factors with Pax-6 results in synergistic activation of the glucagon promoter. *J Biol Chem* 16, 16.

Polezajev, L. V. (1936). *Biol. Z.*, 5 (Berichte, 40)

Popow, W. W. and M. F. Nikitenko. (1937). *Bull. Biol. Et Med. exp. URSS*, 3 (Berichte, 45)

Quinlan, R. A., Sandilands, A., Procter, J. E., Prescott, A. R., Hutcheson, A. M., Dahm, R., Gribbon, C., Wallace, P., and Carter, J. M. (1999). The eye lens cytoskeleton. *Eye* 13, 409-16.

Quinn, J. C., West, J. D., and Hill, R. E. (1996). Multiple functions for Pax6 in mouse eye and nasal development. *Genes Dev* 10, 435-46.

Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., and Gehring, W. J. (1994). Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* 265, 785-9.

Reza, H. M., Ogino, H., and Yasuda, K. (2002). L-Maf, a downstream target of Pax6, is essential for chick lens development. *Mech Dev* 116, 61-73.

Rodda, S., Sharma, S., Scherer, M., Chapman, G., and Rathjen, P. (2001). CRTR-1, a developmentally regulated transcriptional repressor related to the CP2 family of transcription factors. *J Biol Chem* 276, 3324-32.

Rudnick, D. (1944). Early history and mechanics of the chick blastoderm. *Q. Rev. Biol* 19, 187-212.

Sakai, M., Imaki, J., Yoshida, K., Ogata, A., Matsushima-Hibaya, Y., Kuboki, Y., Nishizawa, M., and Nishi, S. (1997). Rat maf related genes: specific expression in chondrocytes, lens and spinal cord. *Oncogene* 14, 745-50.

Sawada, K., Agata, K., Yoshiki, A., and Eguchi, G. (1993). A set of anti-crystallin monoclonal antibodies for detecting lens specificities: beta-crystallin as a specific marker for detecting lentoidogenesis in cultures of chicken lens epithelial cells. *Jpn J Ophthalmol* 37, 355-68.

Scaffidi, P., and Bianchi, M. E. (2001). Spatially precise DNA bending is an essential activity of the sox2 transcription factor. *J Biol Chem* 276, 47296-302.

Servetnick, M., and Grainger, R. M. (1991). Changes in neural and lens competence in *Xenopus* ectoderm: evidence for an autonomous developmental timer. *Development* 112, 177-88.

Sharon-Friling, R., Richardson, J., Sperbeck, S., Lee, D., Rauchman, M., Maas, R., Swaroop, A., and Wistow, G. (1998). Lens-specific gene recruitment of zeta-crystallin through Pax6, Nrl-Maf, and brain suppressor sites. *Mol Cell Biol* 18, 2067-76.

Spemann H. *Embryonic Development and Induction*. (1938). New Haven: Yale Univ. Press. 472 pp.

Spemann, H. *Über Korrelationen in der Entwicklung des Auges*. (1901). *Verh. Anat. Ges. Vers. Bonn* 15, 61-79.

Sueyoshi, T., Kobayashi, R., Nishio, K., Aida, K., Moore, R., Wada, T., Handa, H., and Negishi, M. (1995). A nuclear factor (NF2d9) that binds to the male-specific P450 (Cyp 2d-9) gene in mouse liver. *Mol Cell Biol* 15, 4158-66.

Tanaka, T., Tsujimura, T., Takeda, K., Sugihara, A., Maekawa, A., Terada, N., Yoshida, N., and Akira, S. (1998). Targeted disruption of ATF4 discloses its essential role in the formation of eye lens fibres. *Genes Cells* 3, 801-10.

Tomarev, S. I., Sundin, O., Banerjee-Basu, S., Duncan, M. K., Yang, J. M., and Piatigorsky, J.

(1996). Chicken homeobox gene Prox 1 related to *Drosophila prospero* is expressed in the developing lens and retina. *Dev Dyn* 206, 354-67.

Ton, C. C., Hirvonen, H., Miwa, H., Weil, M. M., Monaghan, P., Jordan, T., van Heyningen, V., Hastie, N. D., Meijers-Heijboer, H., Drechsler, M., and et al. (1991). Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox- containing gene from the aniridia region. *Cell* 67, 1059-74.

Uchikawa, M., Kamachi, Y., and Kondoh, H. (1999). Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mech Dev* 84, 103-20.

van den, IJssel P. R., Smulders, R. H., de Jong, W. W., and Bloemendal, H. (1996). alpha-Crystallin: molecular chaperone and heat shock protein. *Ophthalmic Res* 28, 39-43.

Vogel-Hopker, A., Momose, T., Rohrer, H., Yasuda, K., Ishihara, L., and Rapaport, D. H. (2000). Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development. *Mech Dev* 94, 25-36.

Volker, J. L., Rameh, L. E., Zhu, Q., DeCaprio, J., and Hansen, U. (1997). Mitogenic stimulation of resting T cells causes rapid phosphorylation of the transcription factor LSF and increased DNA-binding activity. *Genes Dev* 11, 1435-46.

Wawersik, S., Purcell, P., Rauchman, M., Dudley, A. T., Robertson, E. J., and Maas, R. (1999). BMP7 acts in murine lens placode development. *Dev Biol* 207, 176-88.

Webb, J. F., and Noden, D. M. (1993). Ectodermal placodes: Contributions to the development of the vertebrate head. *Am. Zool* 33, 434-447.

Weintraub, H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241-4.

Weiss, M. A. (2001). Floppy SOX: mutual induced fit in hmg (high-mobility group) box-DNA recognition. *Mol Endocrinol* 15, 353-62.

Wigle, J. T., Chowdhury, K., Gruss, P., and Oliver, G. (1999). Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat Genet* 21, 318-22.

Wilanowski, T., Tuckfield, A., Cerruti, L., O'Connell, S., Saint, R., Parekh, V., Tao, J.,

Cunningham, J. M., and Jane, S. M. (2002). A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to *Drosophila* grainyhead. *Mech Dev* 114, 37-50.

Wistow, G. (1995). Peptide sequences for beta-crystallins of a teleost fish. *Mol Vis* 1, 1.

Yoshida, T., and Yasuda, K. (2002). Characterization of the chicken L-Maf, MafB and c-Maf in crystallin gene regulation and lens differentiation. *Genes Cells* 7, 693-706.

Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., and Dailey, L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev* 9, 2635-45.

Zhou, W., Clouston, D. R., Wang, X., Cerruti, L., Cunningham, J. M., and Jane, S. M. (2000). Induction of human fetal globin gene expression by a novel erythroid factor, NF-E4. *Mol Cell Biol* 20, 7662-72.

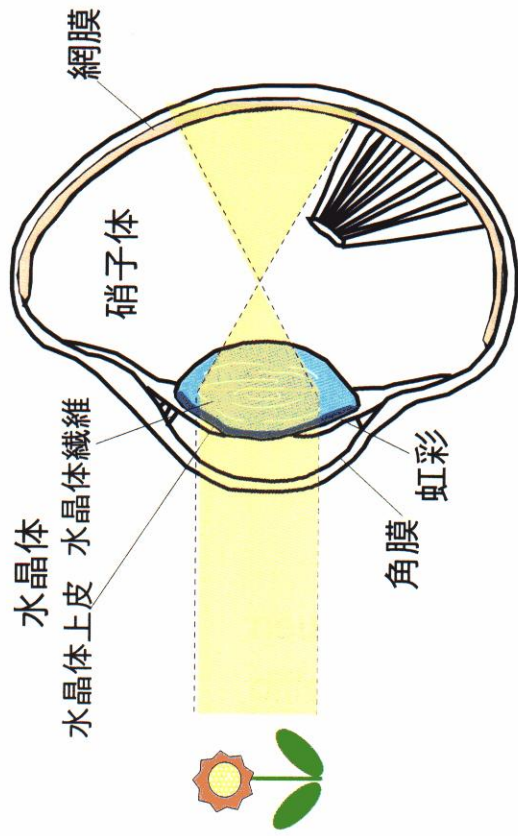
Zhu, C. C., Dyer, M. A., Uchikawa, M., Kondoh, H., Lagutin, O. V., and Oliver, G. (2002). Six3-mediated auto repression and eye development requires its interaction with members of the Groucho-related family of co-repressors. *Development* 129, 2835-2849.

綾-村田友子, 島田直子, 安田國雄. (1999). 生体内レポーターアッセイへの応用. *細胞工学* 18, 1858-1863..

綾 友子, 安田國雄. (1999). 水晶体誘導シグナルを伝える因子. *実験医学* 17, 113-117.

荻野 肇, 安田國雄. (1996). クリスタリン遺伝子発現制御と *maf* ファミリー. *蛋白質核酸酵素* 41, 100-107.

A



B



ステージ10    ステージ11    ステージ14    ステージ17

図1 ニワトリの眼の構造 (A) および発生の初期過程の模式図 (B)

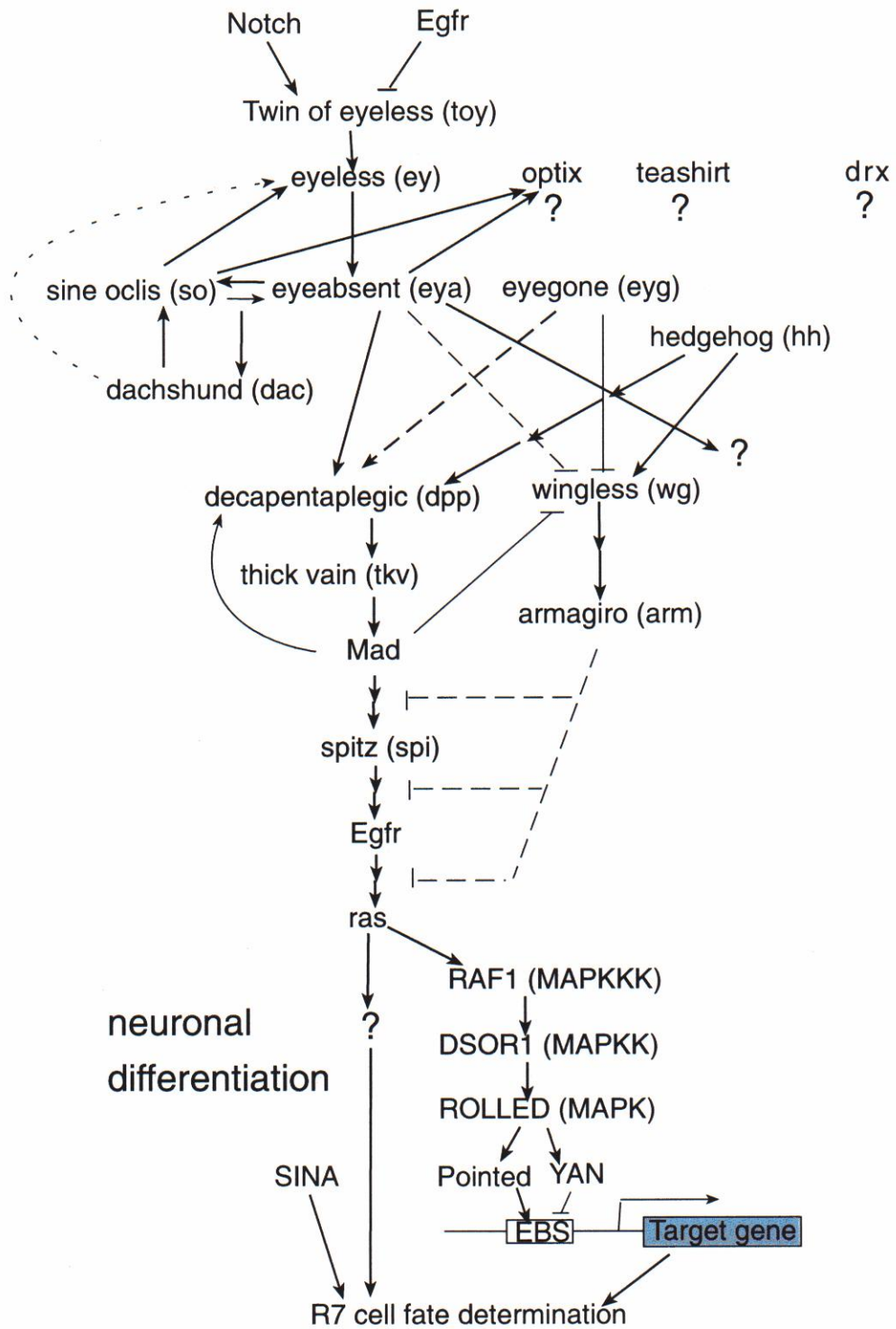


図2 ショウジョウバエの眼の発生過程で働く因子の分子カスケード。これまでに明らかになっている因子とその上下関係を示す。尚、波線は時期特異的な作用、点線は推定上の作用を示す。(O'Neill, 1994; Chow and Lang, 2001; Kumar and Moses, 2001)



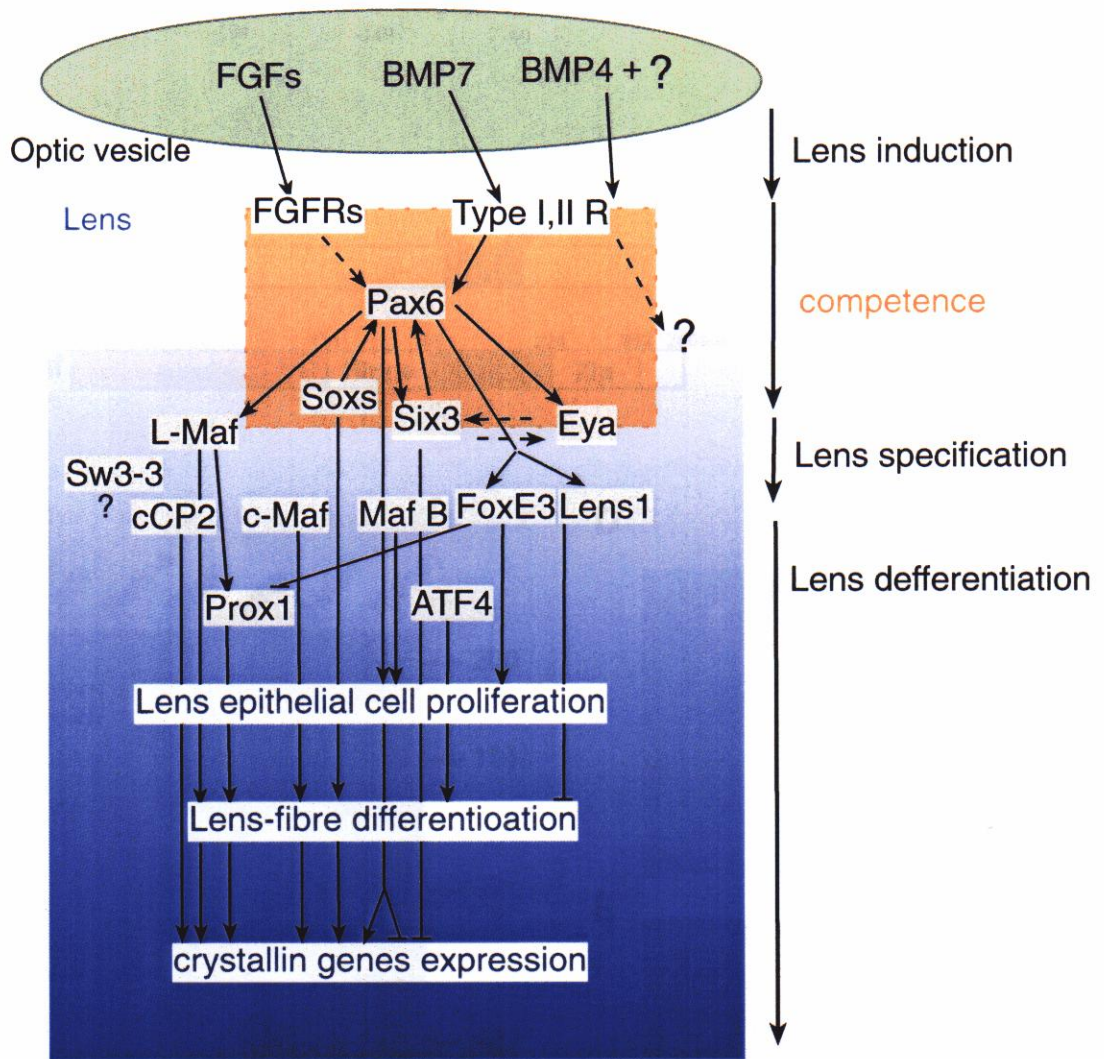


図3 脊椎動物の水晶体の発生過程で働く因子の分子カスケード  
 これまでに明らかになっている因子とその上下関係を示した。尚、点線は  
 推定上の作用を示した。(Jean et al., 1998; Chow and Lang, 2001)

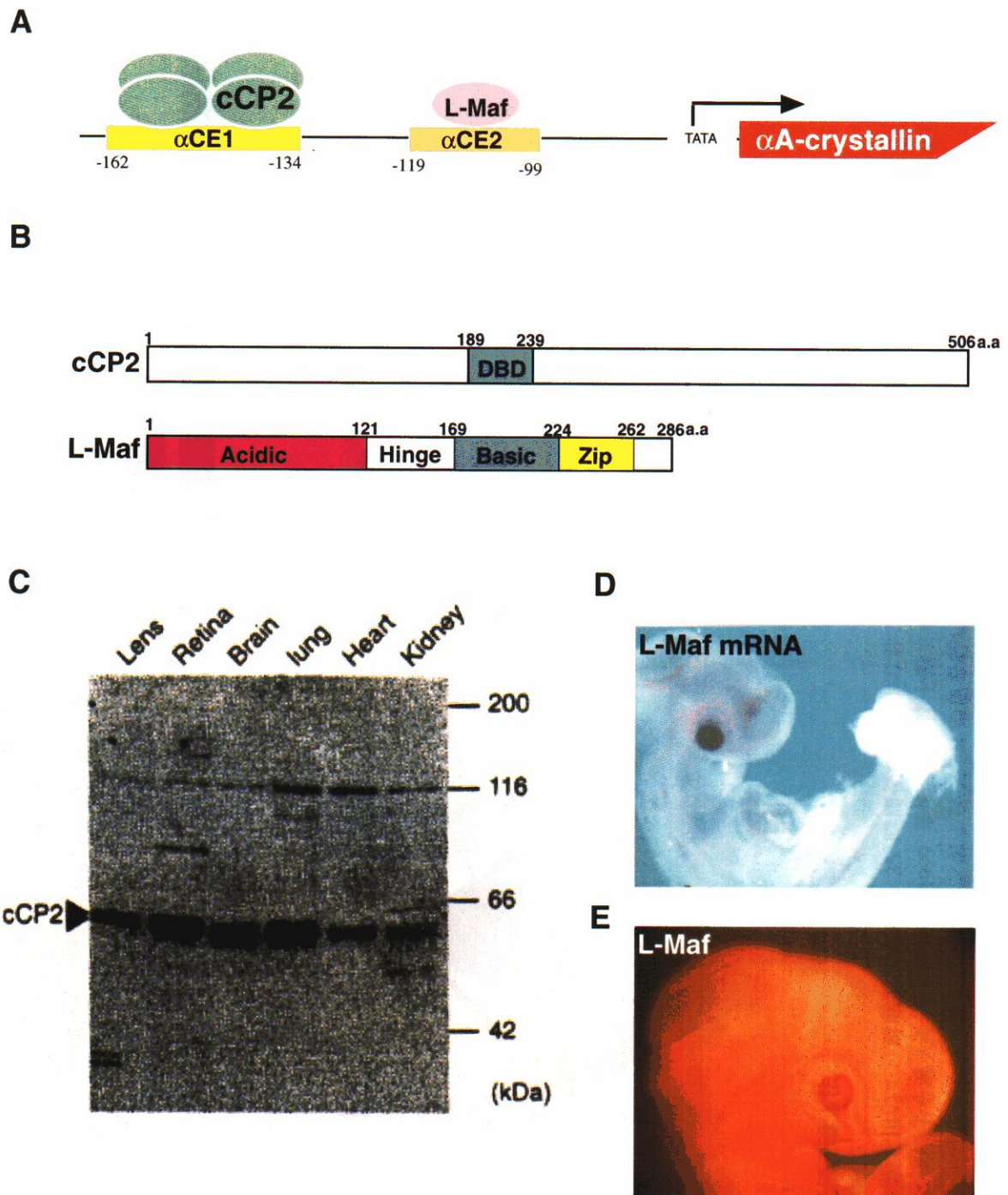


図4 cCP2 と L-Maf

(A)  $\alpha$ A-クリスタリンの上流には二つのエンハンサー配列、 $\alpha$ CE1 と  $\alpha$ CE2 が存在し (Matsuo and Yasuda, 1992)、それぞれに cCP2 および L-Maf が結合する (Murata et al., 1998; Ogino and Yasuda, 1998)。

(B) cCP2 および L-Maf の一次構造 (Murata et al., 1998; Ogino and Yasuda, 1998)。

(C) cCP2 の発現 (Murata et al., 1998)。

(D) L-Maf mRNA の水晶体特異的な発現 (Ogino and Yasuda, 1998)。

(E) L-Maf の水晶体特異的な発現。



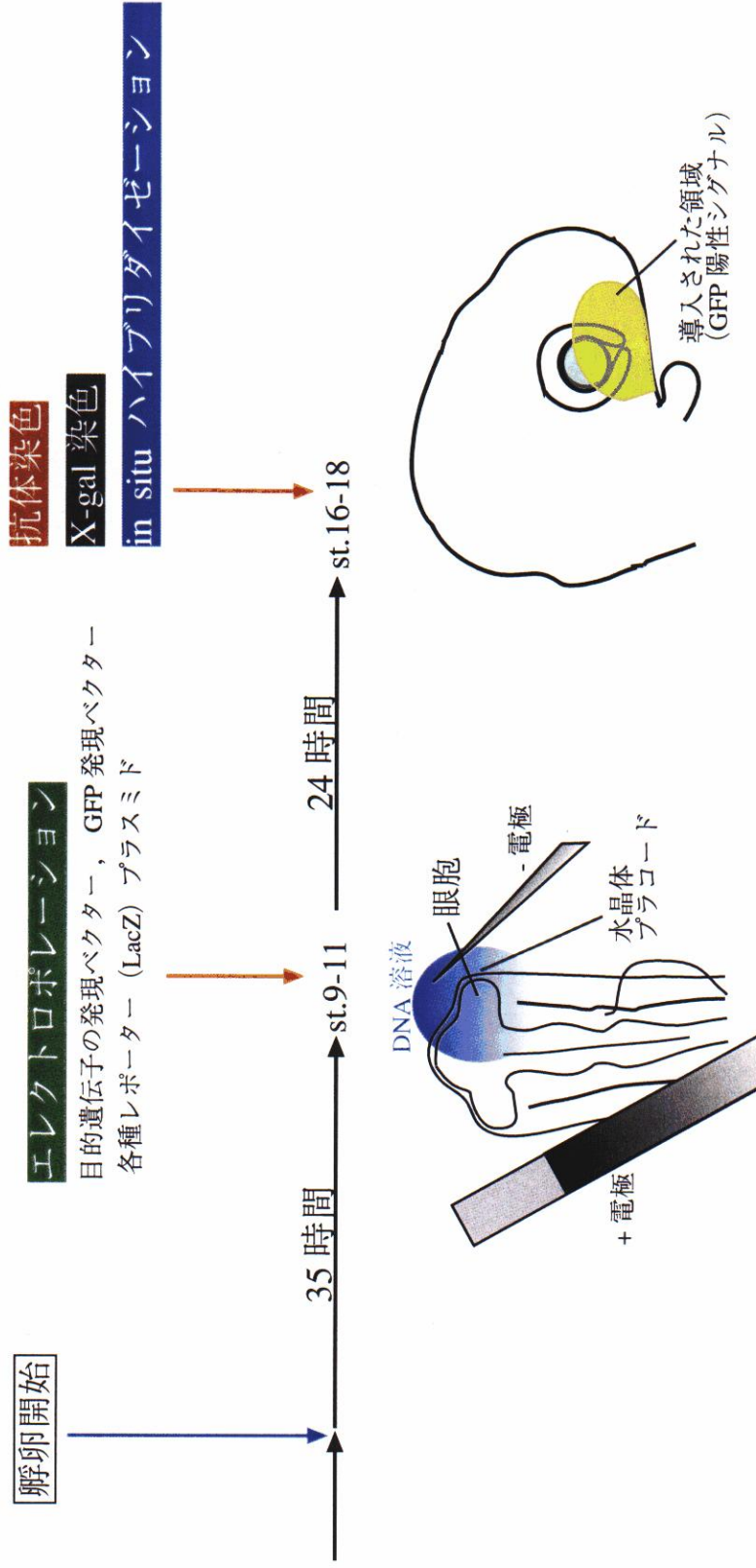


図5 ニワトリ初期胚への遺伝子導入法

エレクトロポレーション法を用いて、孵卵開始から約 35 時間後のニワトリ胚 (ステージ 9 ~ 11、水晶体プラココードが形成されはじめる時期) の頭部外胚葉の様々な領域に遺伝子を導入した (詳細は 1999 年度 島田 修士論文参照)。導入後、さらに 24 時間発生を進行させた胚 (ステージ 14~17) に対して、抗体染色、in situ ハイブリダイゼーションおよび X-gal 染色を行い、目的遺伝子の機能を解析した。

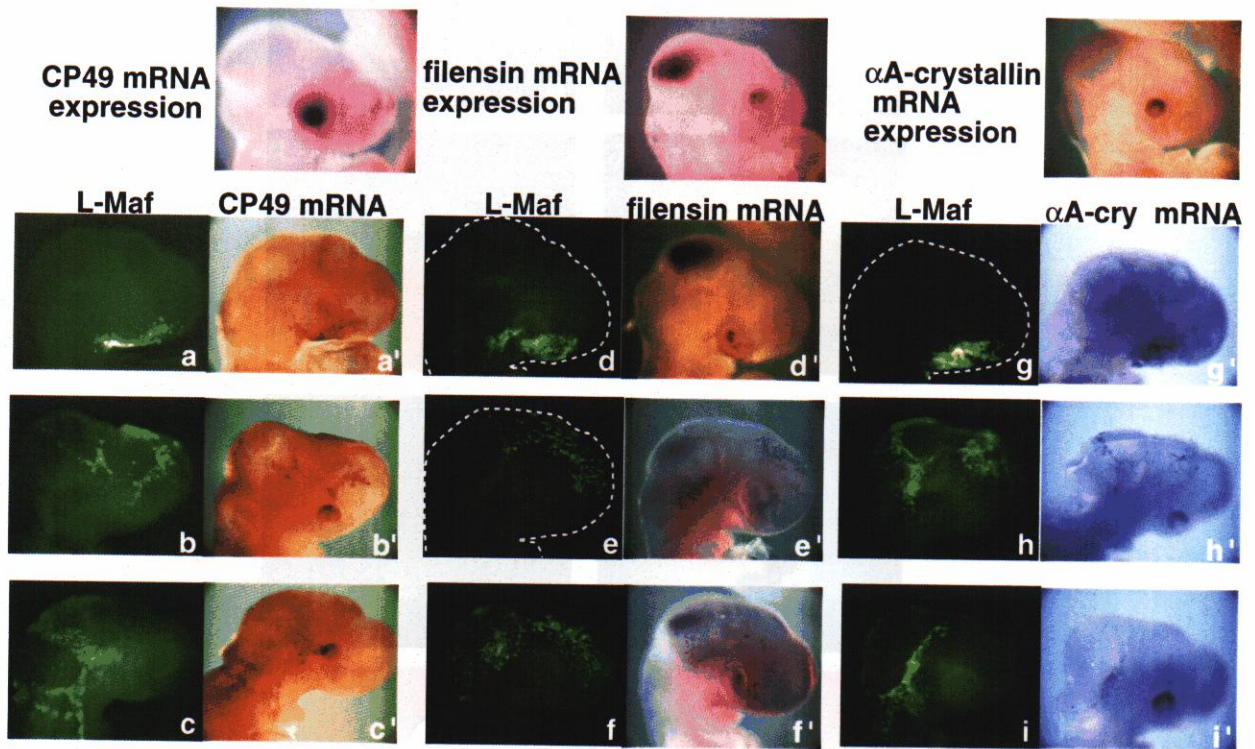


図6 L-Mafの強制発現による各水晶体分化マーカーの発現誘導

エレクトロポレーション法により、L-Maf発現ベクターをGFP発現ベクターと共に水晶体プラコードが形成される時期(ステージ9~11)のニワトリ胚頭部外胚葉の様々な領域に導入後、24時間発生を進行させた。その後、 $\alpha$ A-クリスタリン、CP49 (filensin like)、およびCP95 (filensin) mRNAの発現をホルマウントin situハイブリダイゼーション法により解析した(a-i')。その結果、L-Mafをいずれの領域に導入しても各因子のmRNAの発現が検出された。



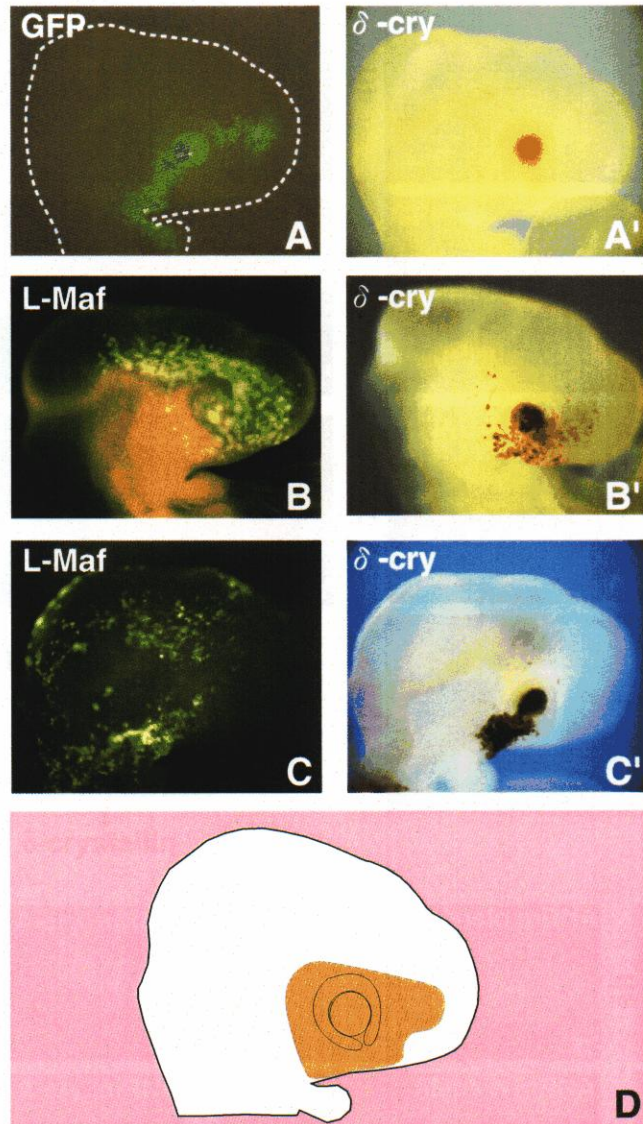


図7 L-Mafの強制発現による $\delta$ -クリスタリンの発現誘導

エレクトロポレーション法により、L-Maf発現ベクターおよびGFP発現ベクターをを水晶体プラコードが形成される時期（ステージ9～11）のニワトリ胚頭部分外胚葉の様々な領域に導入後、24時間発生を進行させた。その後、ホルマウント抗体染色法により $\delta$ -クリスタリンの発現を調べた(A'-C)。遺伝子が導入された領域は共導入したGFPの発現により示されている(A-C)。(D) L-Maf強制発現実験の結果を総合すると、 $\delta$ -クリスタリンの発現(茶色)が誘導されたのは水晶体の周囲の領域に限られていた(詳細は1999年度島田修士論文参照)。

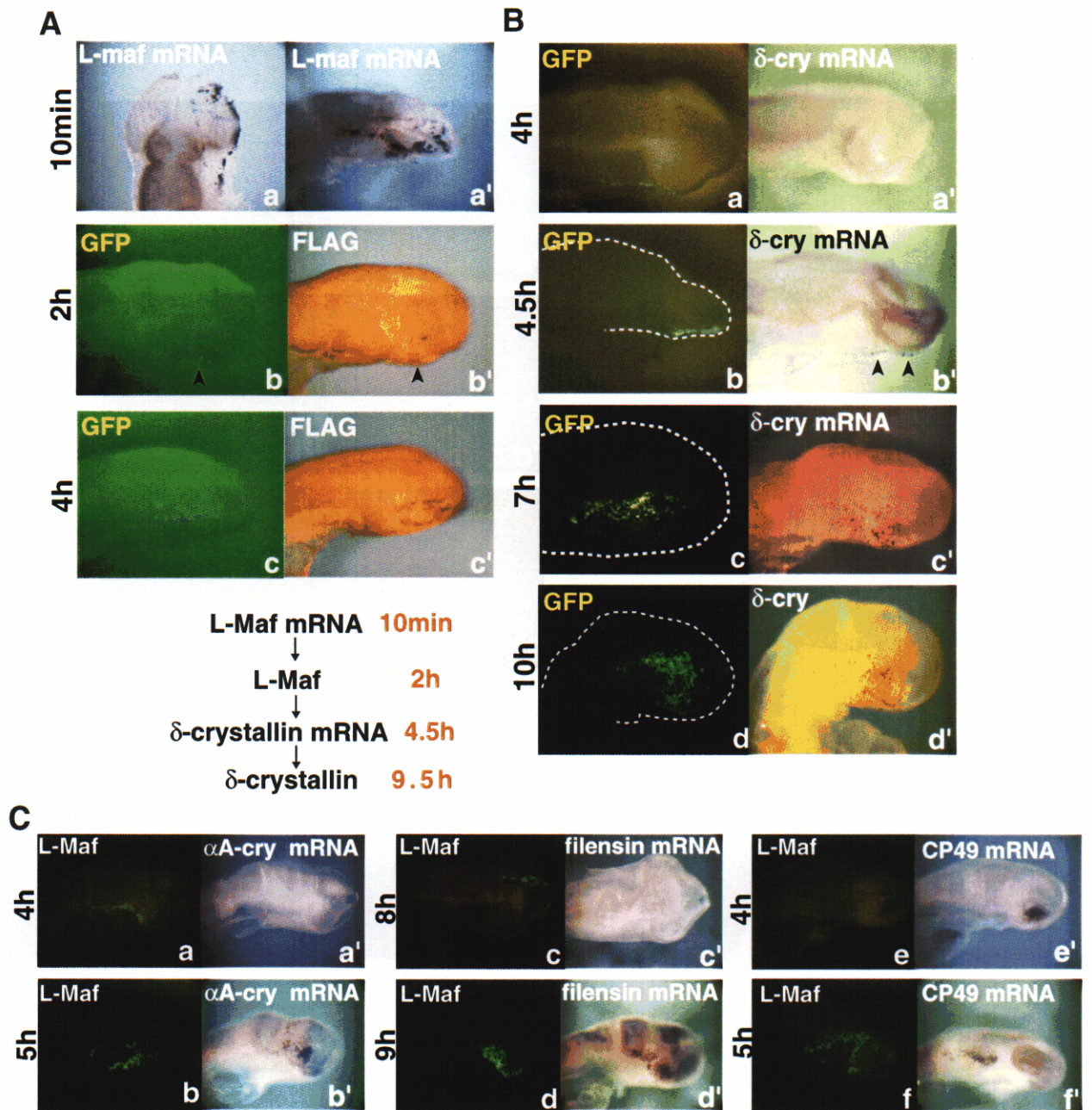


図8 L-Mafの強制発現によりL-Maf mRNA、L-Maf、 $\delta$ -クリスタリン mRNA および $\delta$ -クリスタリンの発現が検出される時間の検討

エレクトロポレーション法により、L-Mafを水晶体プラコードが形成される時期（ステージ9～11）のニワトリ胚頭外部胚葉の水晶体の近傍に導入後、ホルマウント抗体染色、およびin situハイブリダイゼーション法によりL-Maf mRNA、L-Maf (A)、 $\delta$ -クリスタリン mRNA および $\delta$ -クリスタリン (B)の発現が検出される時間を調べた。L-Maf mRNAの発現は、L-Maf導入後から10分間 (Aa, a')、L-Mafは2時間で検出され始め (Ab')、4時間後では十分量のL-Mafの発現が観察された (Ac')。GFPの発現の検出時間はL-Mafと同様であった (Ab, c)。 $\delta$ -クリスタリン mRNAの発現は導入後4時間では観察されなかったが (Ba)、4.5時間後から検出され始め (Bb')、7時間後では十分量に達した (Bc')。 $\delta$ -クリスタリンの発現は導入後10時間で検出され始めた (Bd')。一方、他の水晶体分化マーカーの発現は、L-Maf導入後、 $\alpha$ A-クリスタリン、5時間 (Cb')、filensin、9時間 (Cd')、CP49、5時間 (Cf)で検出された。



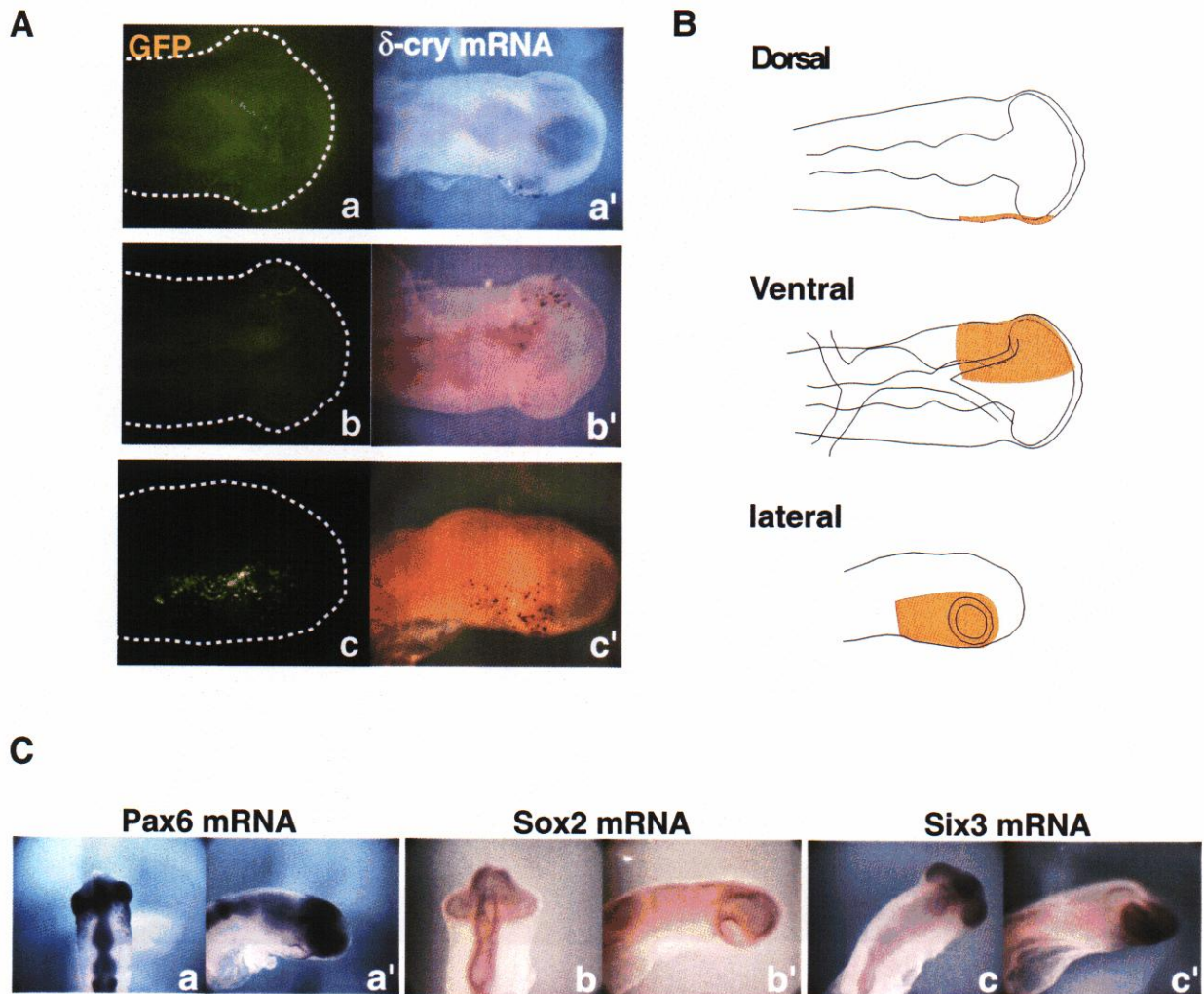


図9 早いステージにおける L-Maf の強制発現による  $\delta$ -クリスタリンの発現誘導

(A) エレクトロポレーション法により、L-Maf 発現ベクターおよび GFP 発現ベクターを水晶体プラコードが形成される時期（ステージ9～11）のニワトリ胚頭外胚葉の様々な領域に導入後、7時間発生を進行させた。その後、ホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法により  $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現を調べた。a,b,c はそれぞれ胚頭部の背側、腹側、側面を撮影したもの。この時期の強制発現実験の結果を総合すると、 $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導されたのは水晶体の周囲の領域に限られていた (B, 茶色)。 (C) 同時期の Pax6、Sox2 および Six3 mRNA の発現。

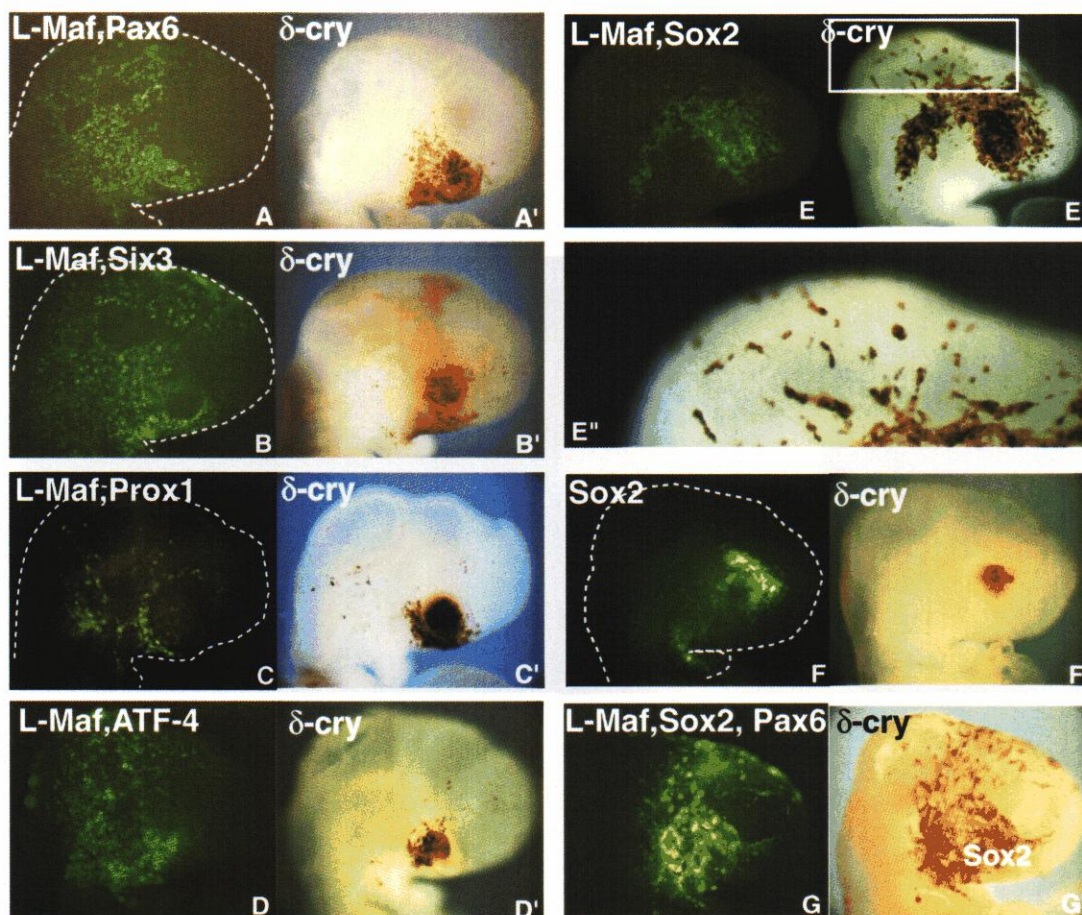


図 10 Sox2 の存在下で L-Maf は、頭部のどの領域においても  $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導する。エレクトロポレーション法により、L-Maf 発現ベクター、GFP 発現ベクターと共に、水晶体形成に関与する様々な転写因子の発現ベクターを水晶体プラコードが形成される時期（ステージ 9~11）のニワトリ胚頭部外胚葉の様々な領域に導入後、24 時間発生を進行させた。その後、ホルマウント抗体染色法により  $\delta$ -クリスタリンの発現を調べた (A-G')。Pax6 および Six3 を L-Maf と共に導入した場合、誘導される  $\delta$ -クリスタリンの発現は L-Maf 単独を導入した場合 (図 7) と比較して、変化は観察されなかった (A-B')。L-Maf と Prox1 および ATF4 を共導入した場合、頭部外胚葉の様々な領域で  $\delta$ -クリスタリンの発現が検出されたが弱かった (C-D')。一方、Sox2 単独では水晶体のごく近傍でしか  $\delta$ -クリスタリン誘導能を持たないが (F, F')、L-Maf と共導入した場合、 $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導できる領域が頭部の全域に拡大した (E, E')。また、 $\delta$ -クリスタリン陽性細胞が水晶体繊維細胞にみられるような伸長した形態を示していた (E' 中の白枠, E'')。L-Maf、Sox2 および Pax6 の三者を共導入しても、誘導される  $\delta$ -クリスタリンの発現は L-Maf と Sox2 二者を導入した場合と変化はみられなかった (G, G')。





図 11 L-Maf と Sox2 の強制発現による隆起状構造物の誘導

エレクトロポレーション法により、L-Maf 発現ベクターおよび Sox2 発現ベクターを GFP 発現ベクターと共に水晶体プラコードが形成される時期（ステージ 9～11）のニワトリ胚頭外胚葉に導入後、3 日間発生を進行させた。遺伝子が導入された領域は共導入した GFP の発現により示されている（左）。遺伝子が多く導入された領域で 24 時間後では観察されない隆起した構造物の形成が確認された（右）。なお、このような構造物の形成は L-Maf 単独を導入した場合にはみられなかった（図示さず）。

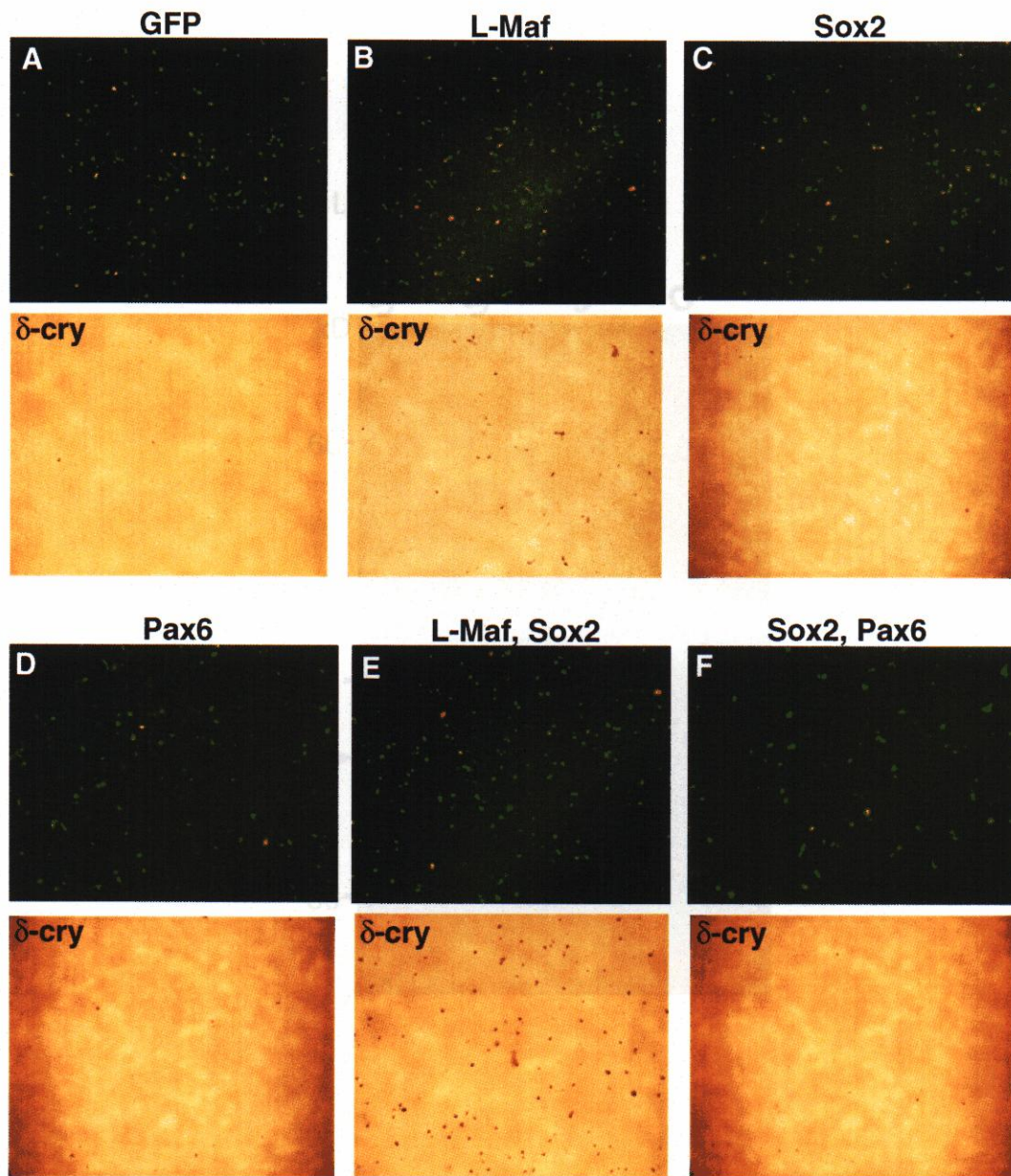


図 12 培養細胞における L-Maf および Sox2 の強制発現

ニワトリ神経性網膜細胞に GFP、L-Maf、Sox2 および Pax6 の各発現ベクターを導入し、5日間培養後、抗体染色により  $\delta$ -クリスタリンの発現を観察した (A-F)。導入された細胞は共導入した GFP の陽性シグナルにより示されている。L-Maf 単独を導入した場合、 $\delta$ -クリスタリンの発現は弱く検出されたが (B)、Sox2 および Pax6 単独では検出されなかった (C, D)。一方、L-Maf と Sox2 を共導入した場合、 $\delta$ -クリスタリンの発現量が L-Maf 単独の場合と比較して増加していた (E)。Sox2 と Pax6 の共導入では  $\delta$ -クリスタリンの発現は検出されなかった (F)。



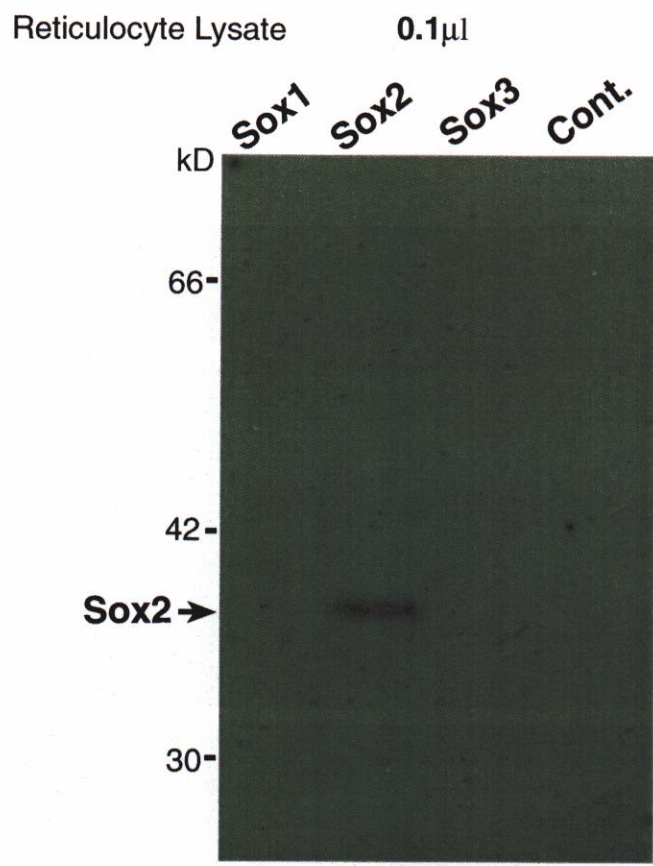


図 13 抗 Sox2 抗体は Sox2 特異的に結合する。  
再合成系により産生させた Sox1-3 に対する抗 Sox2 抗体を用いたウエスタンブロット。

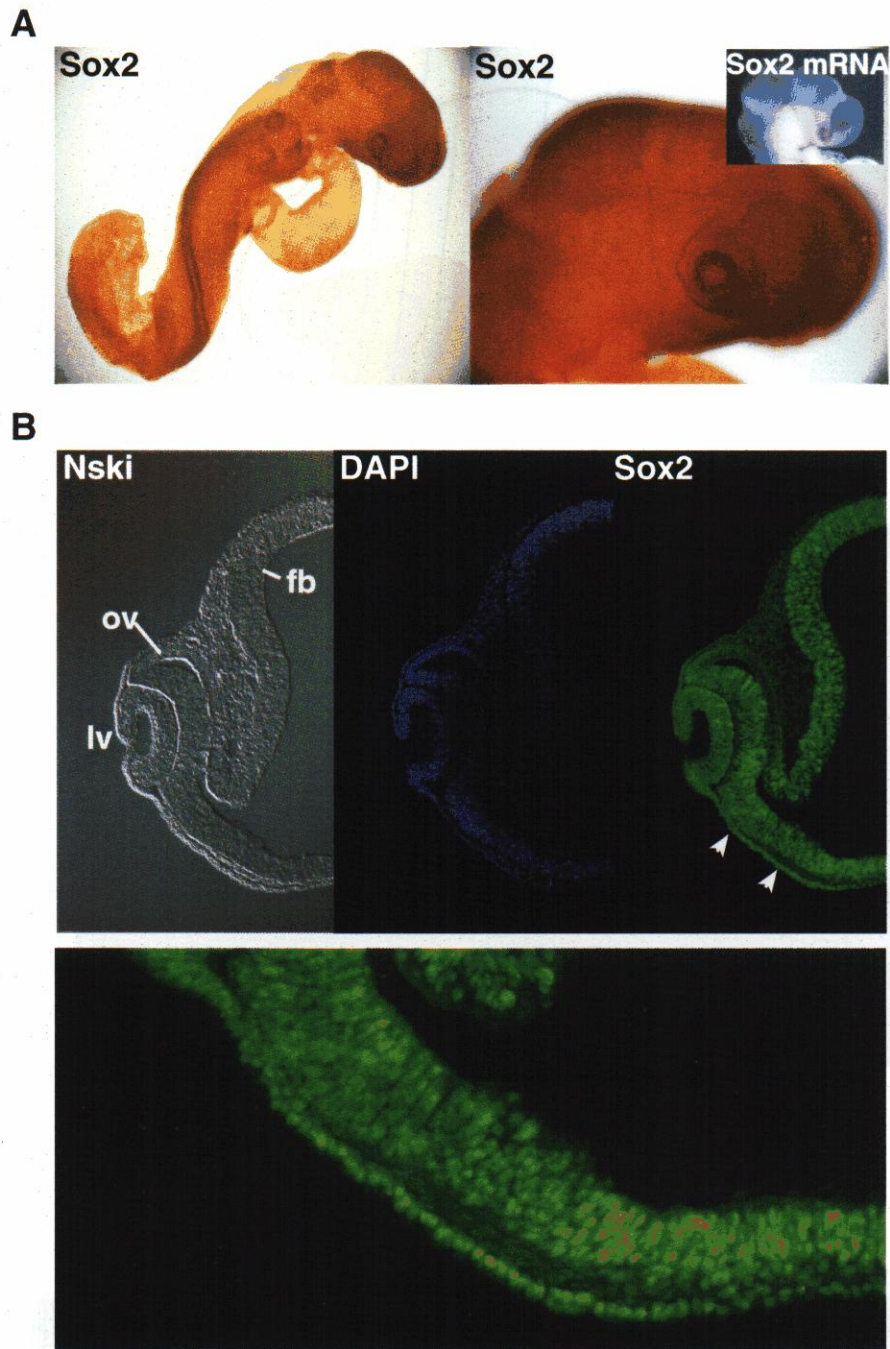
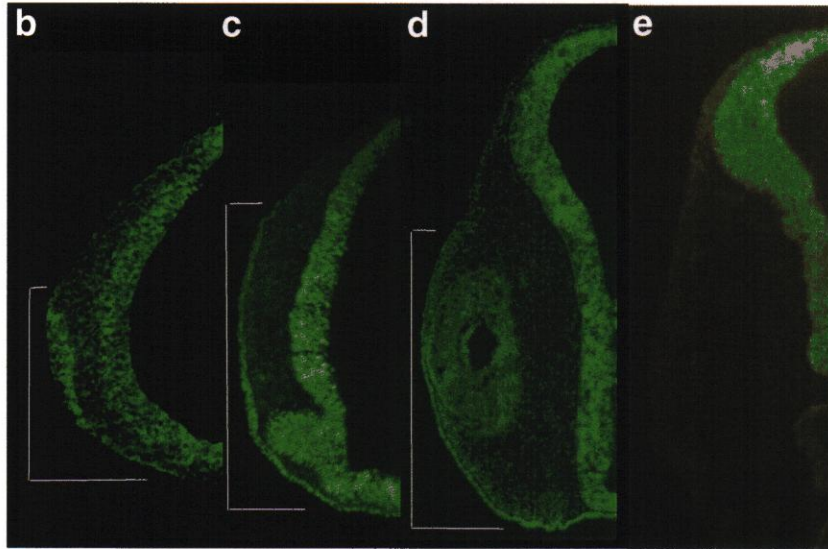
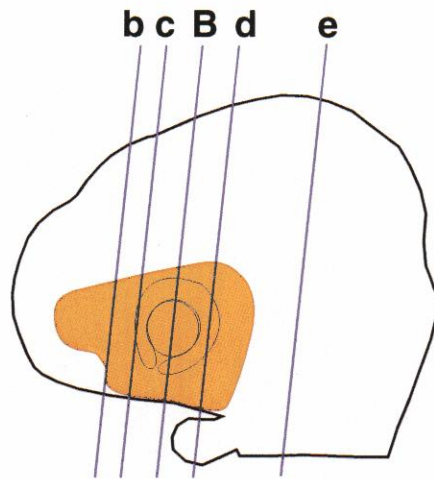


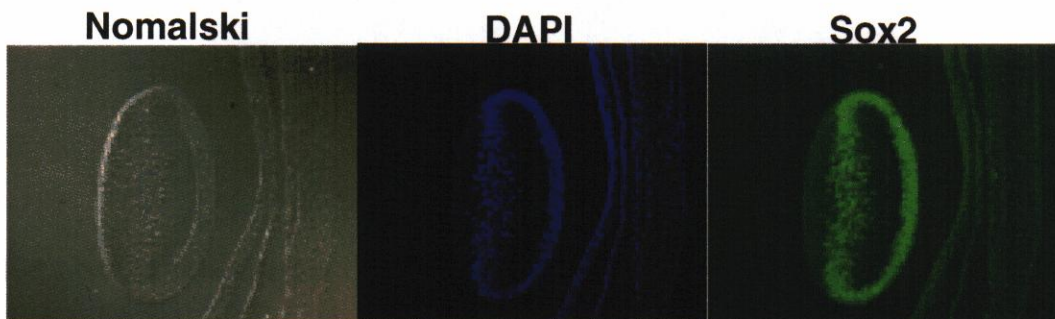
図 14 Sox2 の発現

ホルマウントおよび切片抗体染色法により Sox2 の発現を調べた (A-D)。Sox2 の発現はステージ 18 のホルマントにおいても (A)、ステージ 18 (B) および 6 日目の切片 (D; 阪上起世さんによる染色) においても Sox2 mRNA の発現と同様、神経管、神経性網膜、水晶体、および腹側頭部外胚葉で検出された。また、ステージ 18 の頭部の各部位の切片により (C)、Sox2 の発現する領域は、外来性 L-Maf により  $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導される領域 (図 7D) とほぼ同一であることが確認された。

**C**



**D**





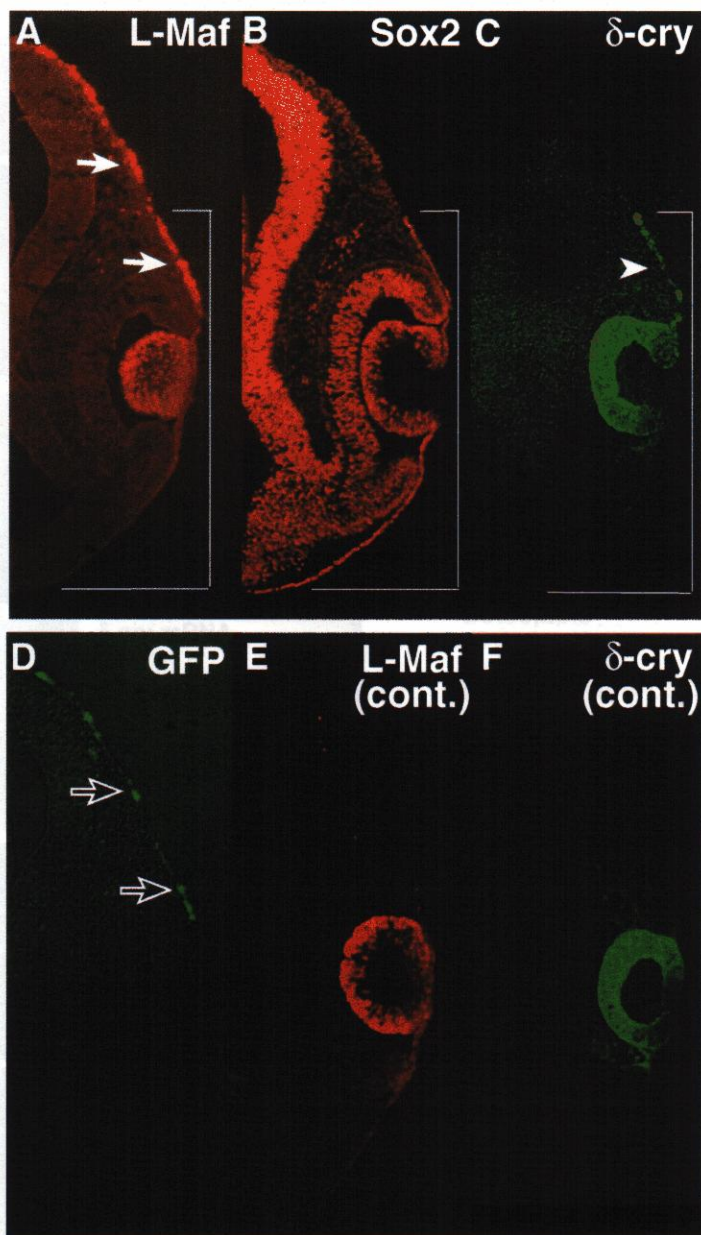


図 15 L-Maf は Sox2 が発現している領域内でのみ  $\delta$ -クリスタリンを誘導する。

エレクトロポレーション法により、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉に L-Maf 発現ベクターおよび GFP 発現ベクターを導入後、24 時間発生を進行させた。その後、切片抗体染色法により L-Maf、 $\delta$ -クリスタリン、および Sox2 の発現を調べた。L-Maf の発現 (A, 白矢印) は、共導入した GFP (D, 白ぬき矢印) と同じ領域で発現している。 $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導された領域 (C, 矢頭) は、Sox2 が発現している領域 (B および白線) 内に限られていた。E、F はそれぞれ内在性の L-Maf および  $\delta$ -クリスタリンの発現を示す。

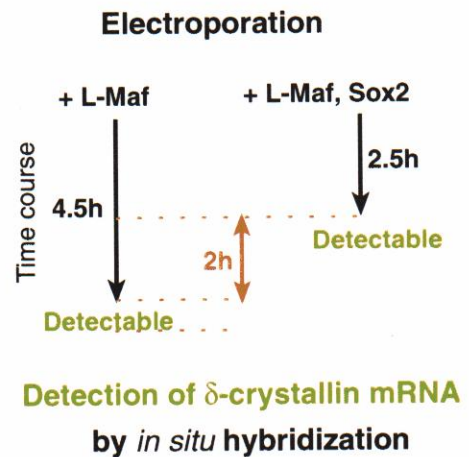
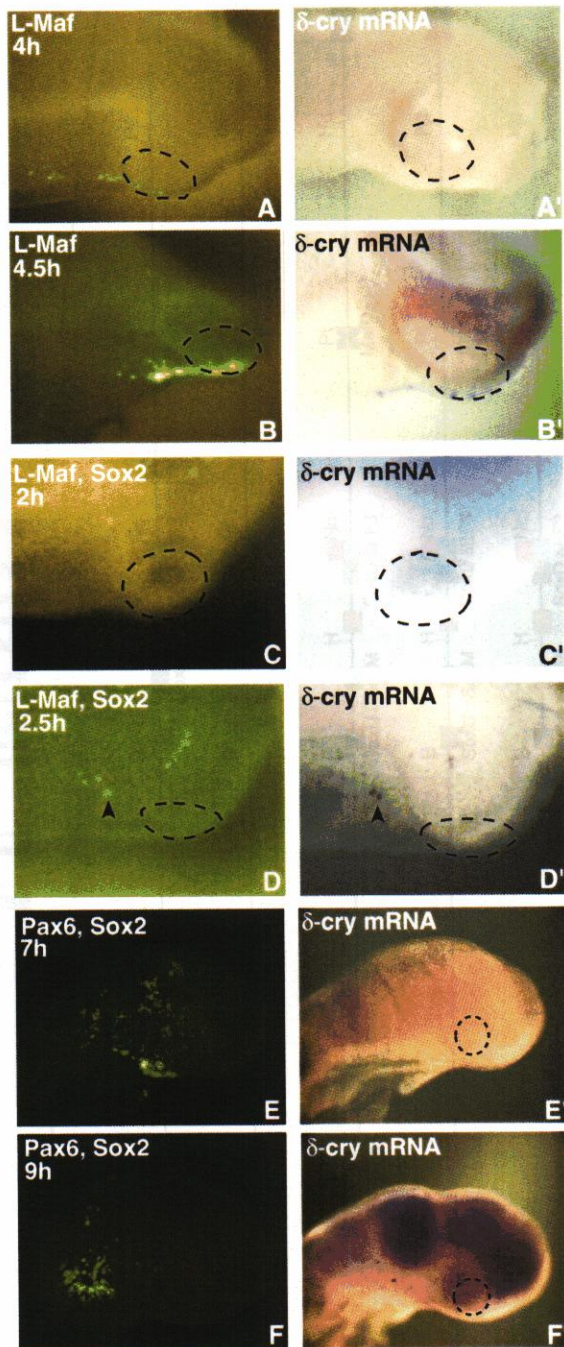


図 16 Sox2 は  $\delta$ -クリスタリンの転写を増強する。

エレクトロポレーション法により、L-Maf を単独、および Sox2 とともに水晶体プラコードが形成される時期（ステージ 9~11）のニワトリ胚頭部外胚葉の水晶体の近傍に導入後、ホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて  $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現が検出される時間を調べた。(A-D')。L-Maf 単独を導入した場合、 $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現は導入後 4 時間では検出されなかったが (A')、4.5 時間後には検出され始めた (B')。Sox2 と共導入した場合、 $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現は導入後 2 時間では検出されなかったが (C')、2.5 時間経過した時点で検出され始めた (D', 矢頭)。一方、Pax6 と Sox2 を共導入した場合には、 $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現は導入後 9 時間で検出された (E-F')。水晶体プラコードの位置は黒い点線で示されている。





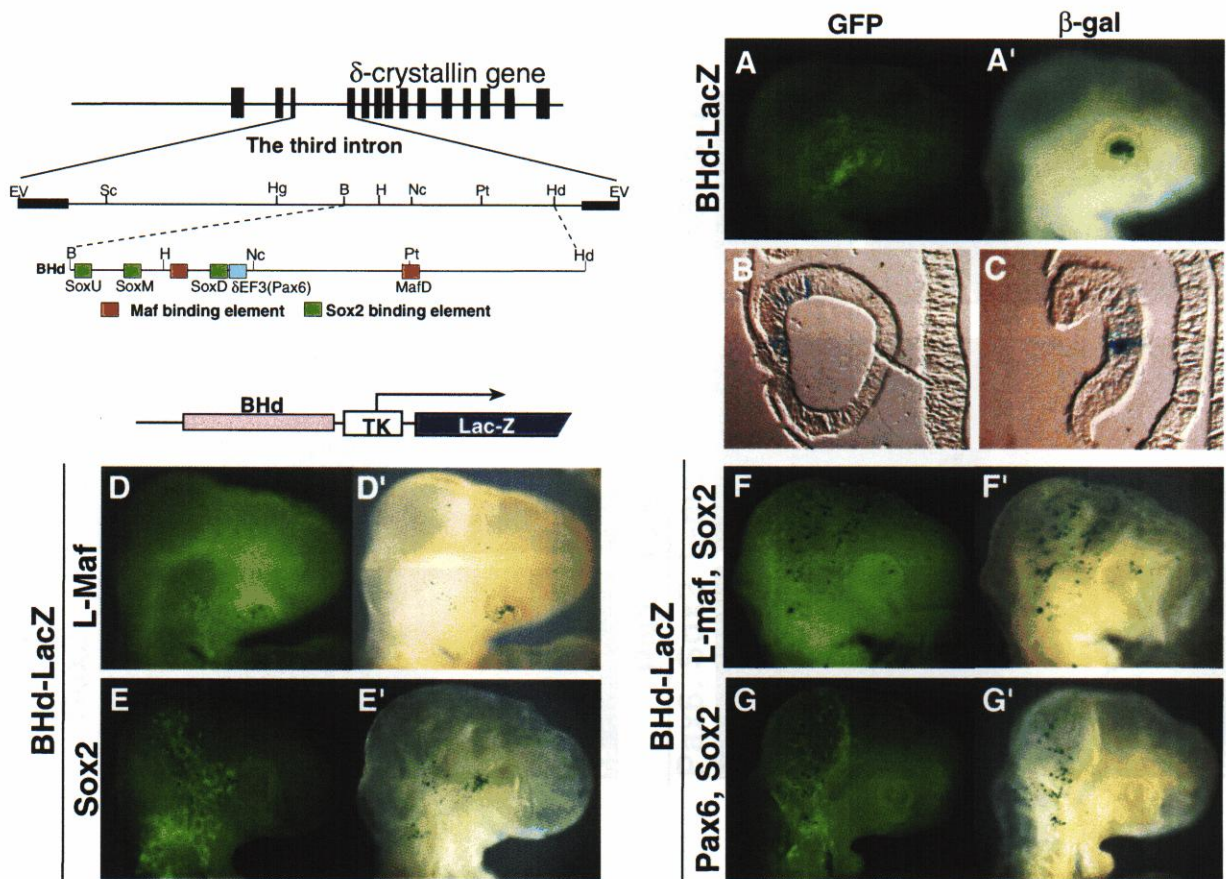


図 18 L-Maf と Sox2 は協調して  $\delta$ -クリスタリン遺伝子の BHd レポーターを活性化する。

エレクトロポレーション法により、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉の水晶体領域の周囲に BHd レポータープラスミドを単独、もしくは L-Maf、Sox2、および Pax6 発現プラスミドと様々に組み合わせて導入した。24 時間培養の後、ホルマウント X-gal 染色を行った。BHd レポーターは単独で水晶体特異的なレポーター活性を示した (A, A')。また切片により、 $\beta$ -gal 陽性細胞は将来の水晶体上皮細胞 (B) と水晶体繊維細胞 (C) いずれにおいても検出された。レポーターを L-Maf もしくは Sox2 と共導入した場合 (D, E)、弱いレポーター活性を示した (D', E')。一方、レポーターと L-Maf、Sox2 を共導入した場合では (F)、Sox2、Pax6 を共導入した場合 (G) と同様、強いレポーター活性が検出された (F', G')。

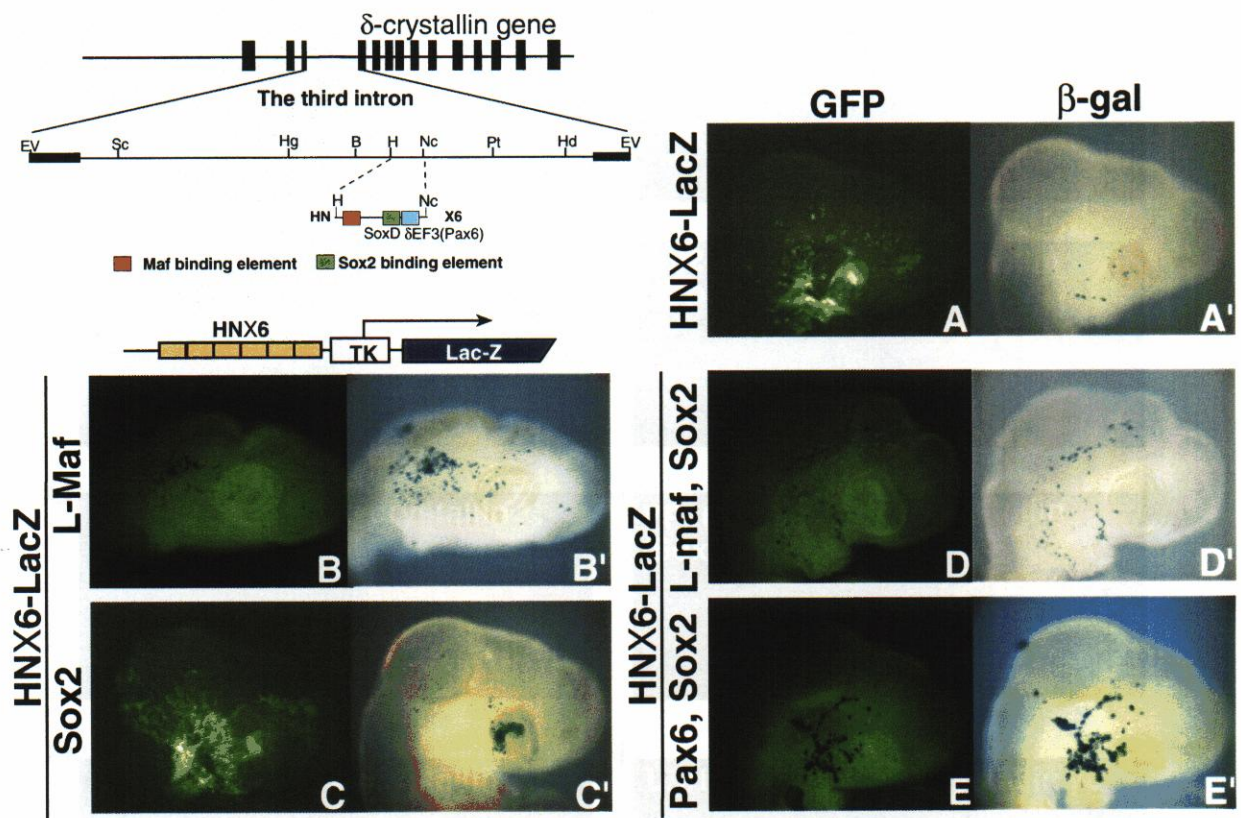


図 19 L-Maf と Sox2 との協調作用には  $\delta$ -クリスタリン遺伝子エンハンサーの HN 領域だけでは不十分である。

エレクトロポレーション法により、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉の水晶体領域の周囲に HN を 6 つタンデムに連結したレポータープラスミド (HNX6) を単独、もしくは L-Maf、Sox2、および Pax6 発現プラスミドと様々な組み合わせで導入した。24 時間培養の後、ホルマウント X-gal 染色を行った。HNX6 レポーター単独を導入した場合 (A)、かなり弱いレポーター活性を示した (A')。レポーターと L-Maf を共導入した場合 (B)、比較的強いレポーター活性が検出された (B')。一方、レポーターと Sox2 との共導入では (C)、レポーター活性のレベルはレポーターのみを導入した場合と同様であった (C')。レポーターを L-Maf、Sox2 と共導入した場合では (D)、L-Maf 単独を導入した場合とレポーター活性のレベルは変化がなかった (D')。一方、レポーターを Sox2、Pax6 と共導入した場合 (E)、強いレポーター活性が示された (E')。



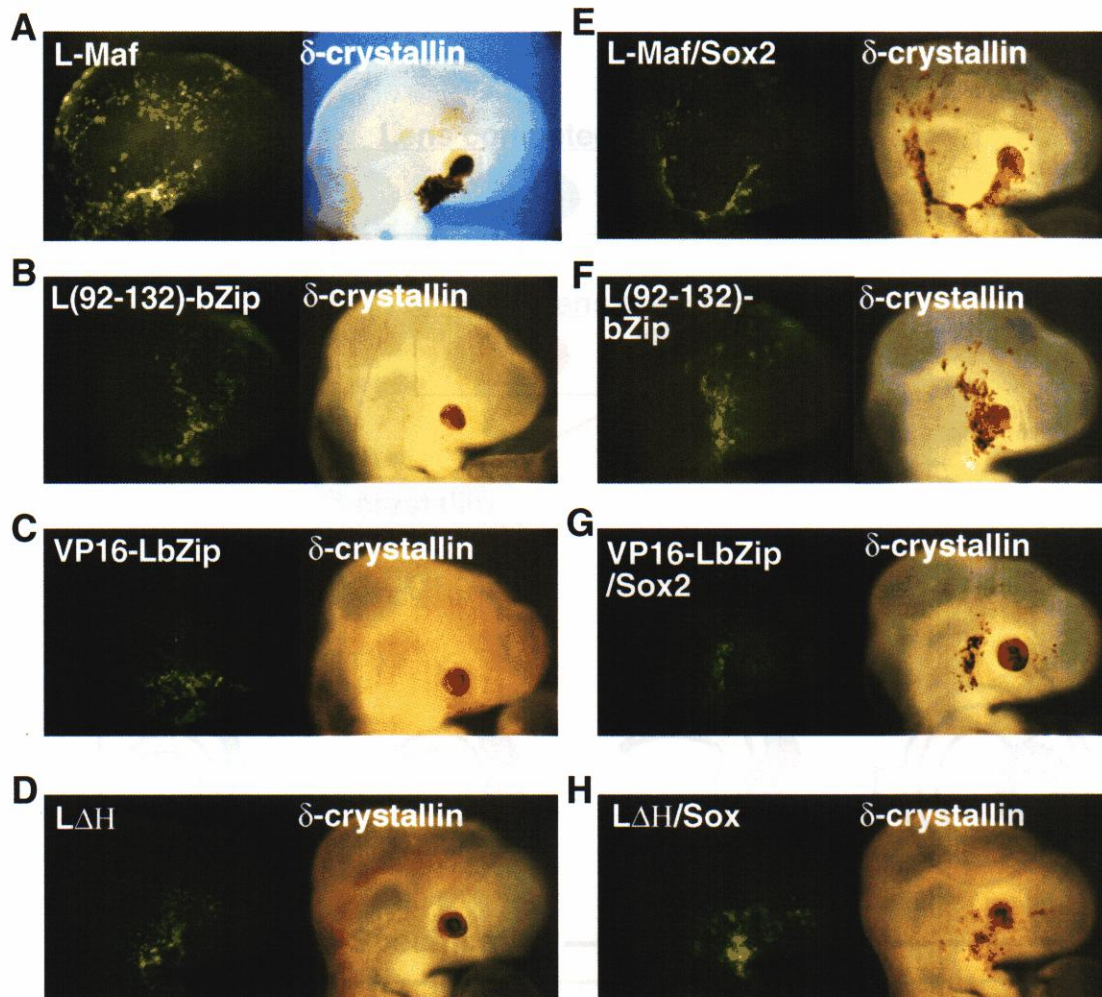


図 20 L-Maf の酸性領域およびヒンジ領域は少なくとも Sox2 との協調作用に用いられない。  
 エレクトロポレーション法により、野生型 L-Maf および各変異型 L-Maf (酸性領域欠失型；L(92-132)-bZip、酸性領域を VP16 に置換したもの；VP16-LbZip、ヒンジ領域欠失型；L $\Delta$ H) の発現ベクターを単独、および Sox2 発現ベクターと共に水晶体プラコードが形成される時期 (ステージ 9~11) のニワトリ胚頭外胚葉に導入後、24 時間発生を進行させた。その後、ホルマウント抗体染色法により  $\delta$ -クリスタリンの発現を調べた (A-H)。変異型 L-Maf の場合、何れも単独では  $\delta$ -クリスタリンの発現を誘導しなかったが (B-D)、Sox2 と共導入した場合、何れも野生型 L-Maf の場合と同様 (E)、広域で誘導した (F-H)。

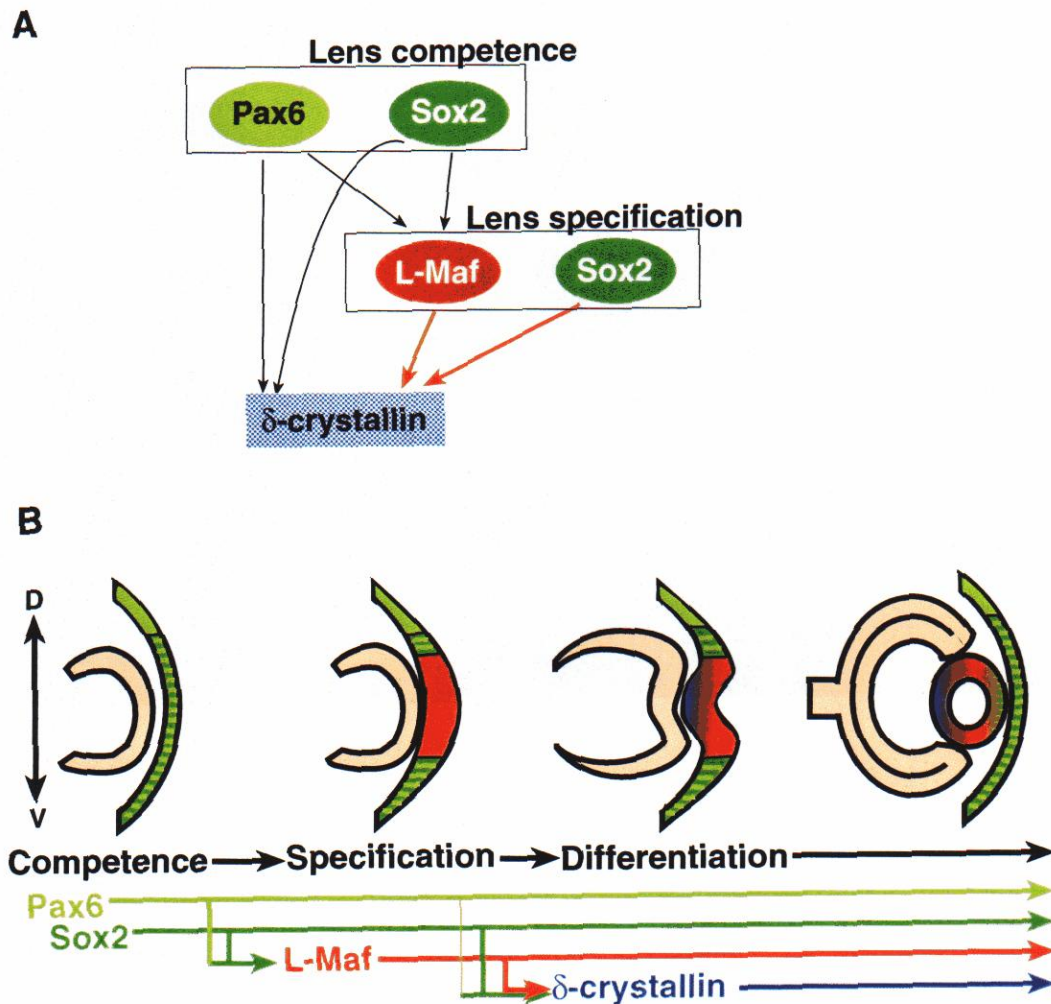


図 21 水晶体の発生段階における遺伝子カスケードモデル

A. 水晶体プラコードの形成に先立ち、Pax6 と Sox2 が水晶体分化コンピテンスを発生して、維持する。続いて、これらが協調して L-Maf の水晶体特異的な発現を誘導する。δ-クリスタリンは、L-Maf に続いて発現する。δ-クリスタリンの発現は以下の三つのパスウェイにより制御される。1. L-Maf と Sox2 による直接的な発現制御。2. Pax6 と Sox2 による直接的な発現制御。3. Prox1 を介した弱い発現制御。

B. 水晶体発生の各ステージと各遺伝子の発現の模式図。



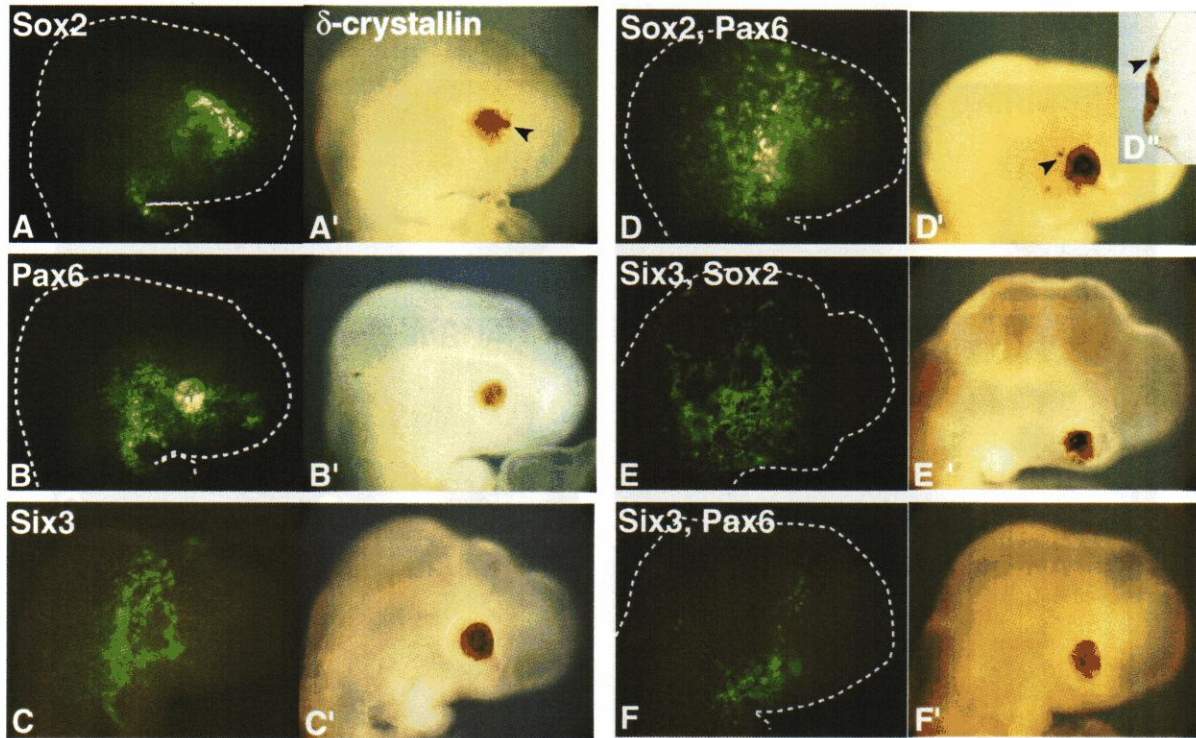


図 22 Sox2、Pax6 および Six3 の強制発現が  $\delta$ -クリスタリンの発現に及ぼす影響

エレクトロポレーション法により、Sox2、Pax6 および Six3 の発現ベクターを様々な組み合わせで GFP 発現ベクターと共に水晶体プラコードが形成される時期（ステージ 9～11）のニトリ胚頭部外胚葉に導入後、24 時間発生を進行させた。その後、ホルマウント抗体染色法により  $\delta$ -クリスタリンの発現を調べた (A-F)。Sox2 単独を導入した場合、 $\delta$ -クリスタリンの発現は水晶体の近傍で誘導されるのみであるが (A, A 矢頭)、Pax6 と共に導入した場合は (D)、異所的な  $\delta$ -クリスタリン、および水晶体プラコード (D', D'' 矢頭) を誘導した。これらは Kamachi et al. による報告 (2001) と合致している。Six3 は単独を導入しても (C, C')、Sox2 や Pax6 と共導入しても (E-F)、 $\delta$ -クリスタリンの発現には影響を与えなかった。



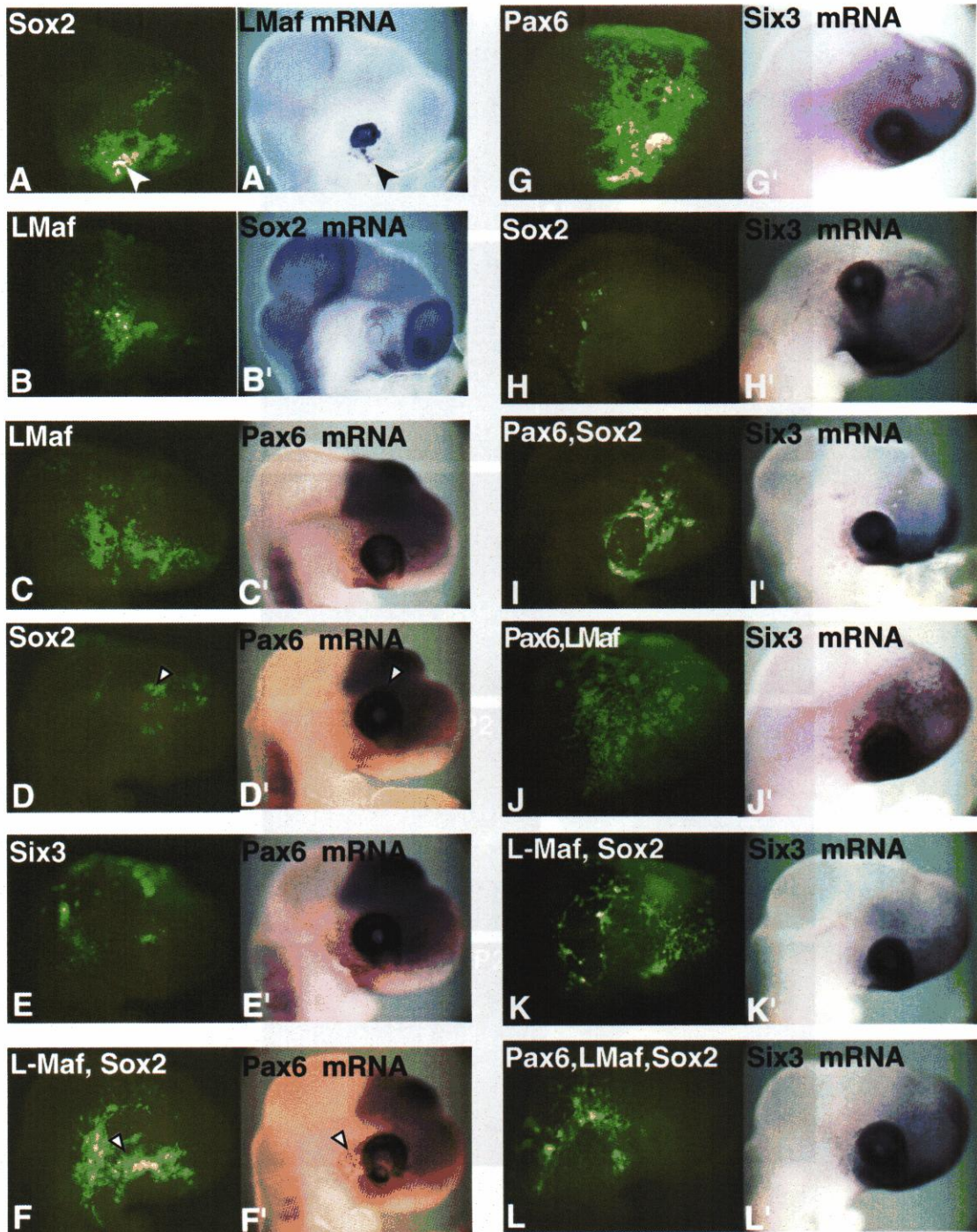


図 23 L-Maf、Sox2、Pax6 および Six3 が互いの発現に与える影響

エレクトロポレーション法により、L-Maf、Sox2、Pax6 および Six3 の発現ベクターを様々な組み合わせで GFP 発現ベクターと共に水晶体プラコードが形成される時期（ステージ 9~11）のニワトリ胚頭外胚葉に導入後、24 時間発生を進行させた。その後、各 mRNA の発現をホルマウント in situ ハイブリダイゼーション法により解析した (A-L)。Sox2 を導入した場合、水晶体の近傍でのみ、L-Maf mRNA の発現を誘導したが (A, 黒矢頭) L-Maf は Sox2 mRNA の発現を誘導しなかった (B')。 (C-F') Pax6 mRNA の発現。Sox2 を導入した場合 (D)、および Sox2 と L-Maf を導入した場合 (F) において異所的な Pax6 mRNA の発現が検出された (D', F' 白矢頭)。各因子をどの組み合わせで導入しても Six3 mRNA の発現には変化がみられなかった。(G-L)。



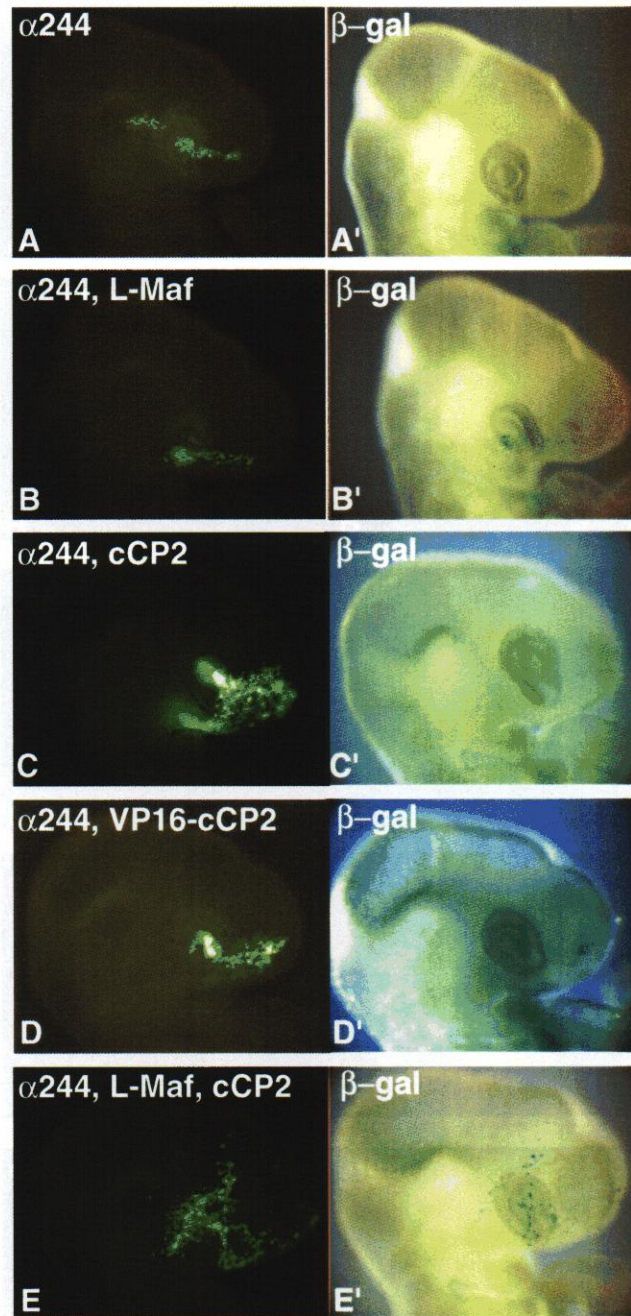


図 24 cCP2 と L-Maf は協調して  $\alpha$ A-クリスタリン遺伝子の  $\alpha$ 244 エンハンサーを活性化する。

エレクトロポレーション法により、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉の水晶体領域の周囲に  $\alpha$ 244 レポータープラスミドを単独、もしくは野生型 cCP2、ドミナントアクティブ型 cCP2 (VP16-cCP2)、および L-Maf と共に導入した。24 時間培養の後、ホルマウント X-gal 染色を行った。 $\alpha$ 244 レポーターを単独 (A)、および野生型 cCP2 と共導入した場合 (C) ではレポーター活性を示さなかった (A', C')。L-Maf (B)、および VP16-cCP2 との共導入 (D) では弱いレポーター活性が観察された (B', D')。一方、レポーターを L-Maf、cCP2 と共導入した場合 (E)、各因子を単独で導入した場合と比較してレポーター活性が若干高くなっていた (E')。

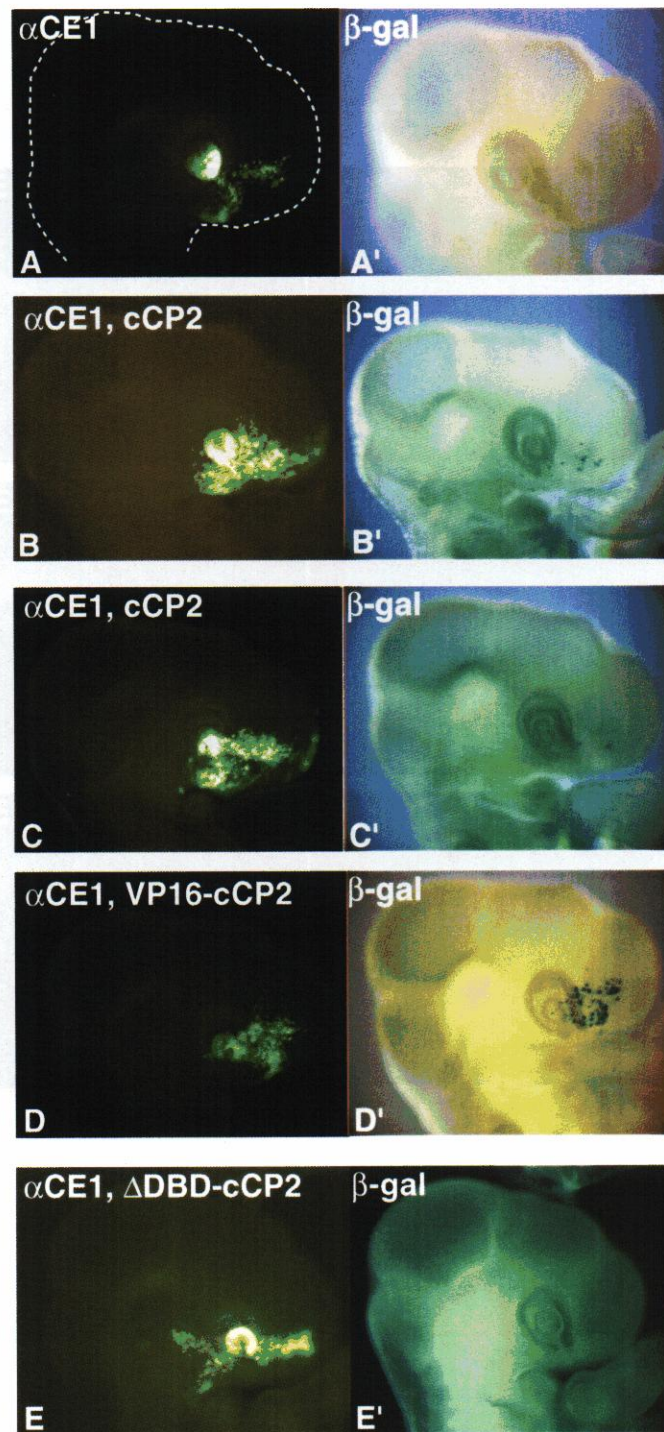


図 25 cCP2 は水晶体内で  $\alpha$ CE1 レポーターを活性化しない。

エレクトロポレーション法により、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉の水晶体領域の周囲に  $\alpha$ CE1X6 レ表皮ポータープラスミドを単独、および野生型 cCP2、ドミナントアクティブ型 cCP2 (VP16-cCP2)、ドミナントネガティブ型 cCP2 ( $\Delta$ DBD-cCP2) と共に導入した。24 時間培養の後、ホルマウント X-gal 染色を行った。レポーターは単独 (A)、および  $\Delta$ DBD-cCP2 と導入した場合 (E)、レポーター活性を示さなかった (A', E')。一方、レポーターを野生型 cCP2 もしくは VP16-cCP2 と共導入した場合 (B-D)、表皮外胚葉においてレポーター活性が検出されたが、水晶体ではほとんど検出されなかった (B'-D')。



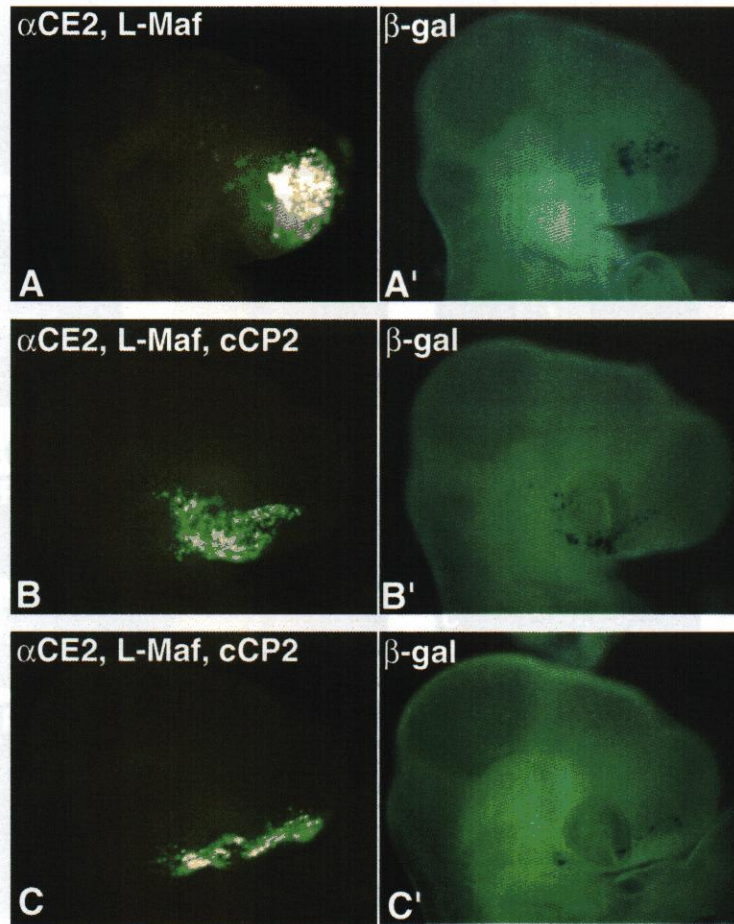


図 26 cCP2 は水晶体内でのみ L-Maf の機能を阻害する

エレクトロポレーション法により、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉の水晶体領域の周囲に  $\alpha$ CE2X6 レポータープラスミドを単独、および cCP2 や L-Maf と共に導入した。24 時間培養の後、ホルマウント X-gal 染色を行った。レポーターを L-Maf と共導入した場合 (A, A')、レポーター活性は水晶体の内外で検出された。一方、cCP2 と L-Maf との共導入では、頭部表皮外胚葉においてレポーター活性が示されたものの、水晶体においては検出されなかった (B-C')。

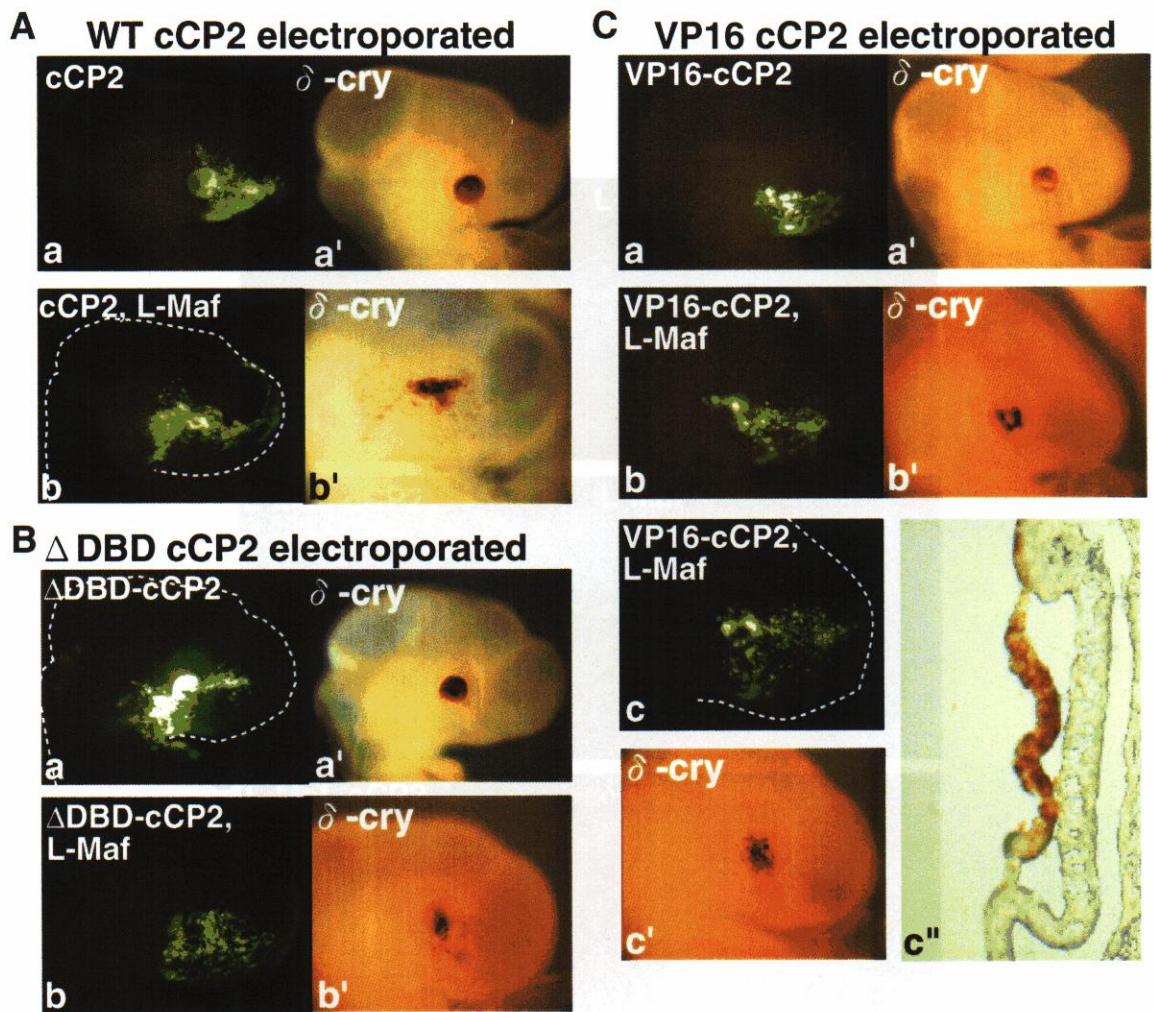


図 27 cCP2 の強制発現は水晶体の陥入、および  $\delta$ -クリスタリンの発現を抑制する。

エレクトロポレーション法により、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉の水晶体領域の周囲に野生型 cCP2 (A)、ドミナントネガティブ型 cCP2 ( $\Delta$ DBD-cCP2) (B)、ドミナントアクティブ型 cCP2 (VP16-cCP2) (C) を単独、もしくは L-Maf と共に導入した。24 時間培養の後、ホルマウント抗体染色により  $\delta$ -クリスタリンの発現を調べた。野生型 cCP2 および  $\Delta$ DBD-cCP2 は  $\delta$ -クリスタリンの発現や水晶体の形態に影響を与えなかったが (Aa', Ba'), VP16-cCP2 では内在性の  $\delta$ -クリスタリンの発現を阻害した (Ca.a')。L-Maf との共導入では、いずれの型の cCP2 も水晶体から離れた位置で  $\delta$ -クリスタリンの発現を抑制した (A b', Bb', Cb', c')。また、野生型 cCP2 と VP16-cCP2 は L-Maf と共に導入することで水晶体の陥入を抑制し、その結果として複数の水晶体の形成が観察された (Ab' 3 個, Cb' 縦割れ 2 個, Cc' 横割れ 2 個)。(Cc'') Cc' の水晶体部分の切片像。



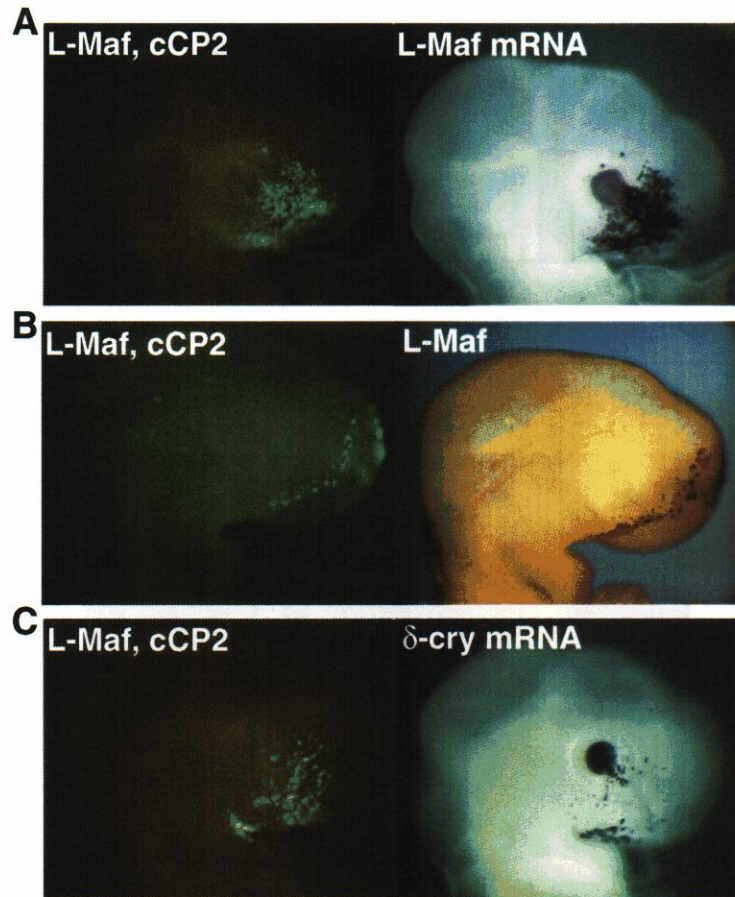


図 28 cCP2 は  $\delta$ -クリスタリン遺伝子の発現を転写段階で抑制する。

エレクトロポレーション法により、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉の水晶体領域の周囲に cCP2 および L-Maf を導入した。24 時間培養の後、ホルマウント抗体染色により L-Maf の発現 (B)、およびホルマウント in situ ハイブリダイゼーションにより L-Maf、 $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現 (A, C) を調べた。このうち  $\delta$ -クリスタリン mRNA の発現 (C) はタンパク質の場合 (図 26) と同様、cCP2 による抑制を受けていた。

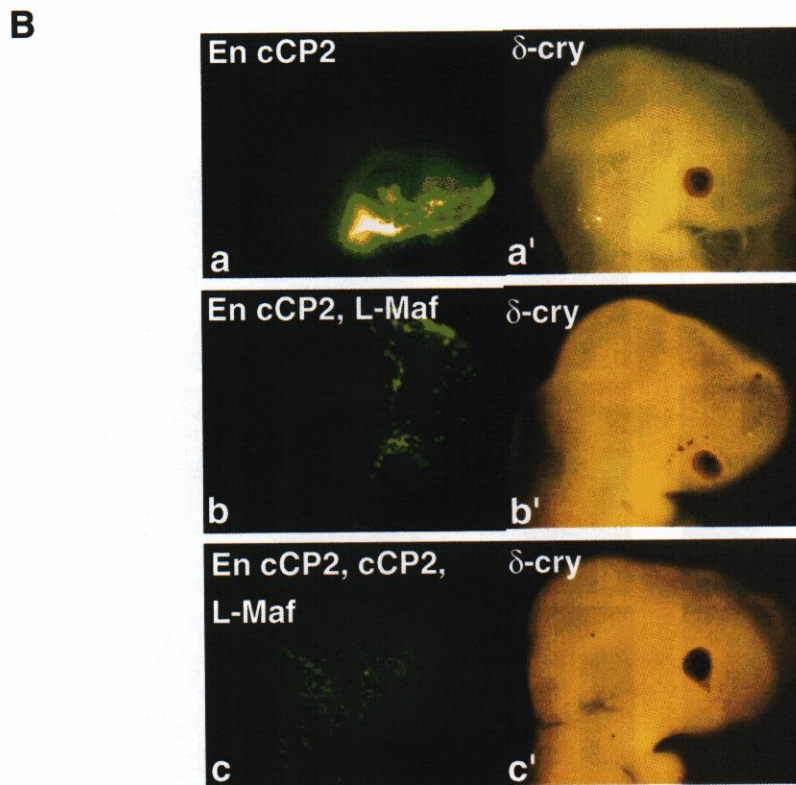
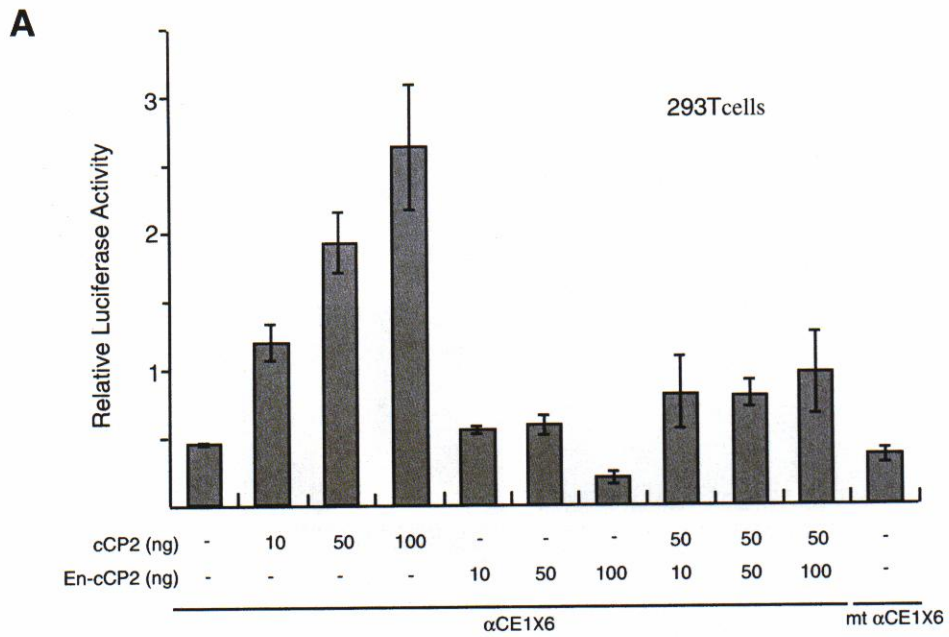


図 29 En-cCP2 の機能

A. cCP2 と En-cCP2 の転写活性化能の比較。cCP2 および En-cCP2 の発現プラスミドを αCE1 レポータープラスミドと共に 293T 細胞に導入した。

B. En-cCP2 の δ-クリスタリンの発現に及ぼす影響

エレクトロポレーション法により、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉に cCP2、En-cCP2、および L-Maf を様々に組み合わせて導入してから 24 時間後、ホルマウント抗体染色により δ-クリスタリンの発現を調べた。En-cCP2 単独では、内在性の δ-クリスタリンの発現には影響を与えなかった (a, a')。En-cCP2 を L-Maf と共に導入すると、cCP2 と同様な δ-クリスタリンの発現抑制作用を示した (b, b')。また、En-cCP2 は cCP2 と共に導入しても、A でみられたような cCP2 の作用に対する負の影響は観察されなかった (c, c')。



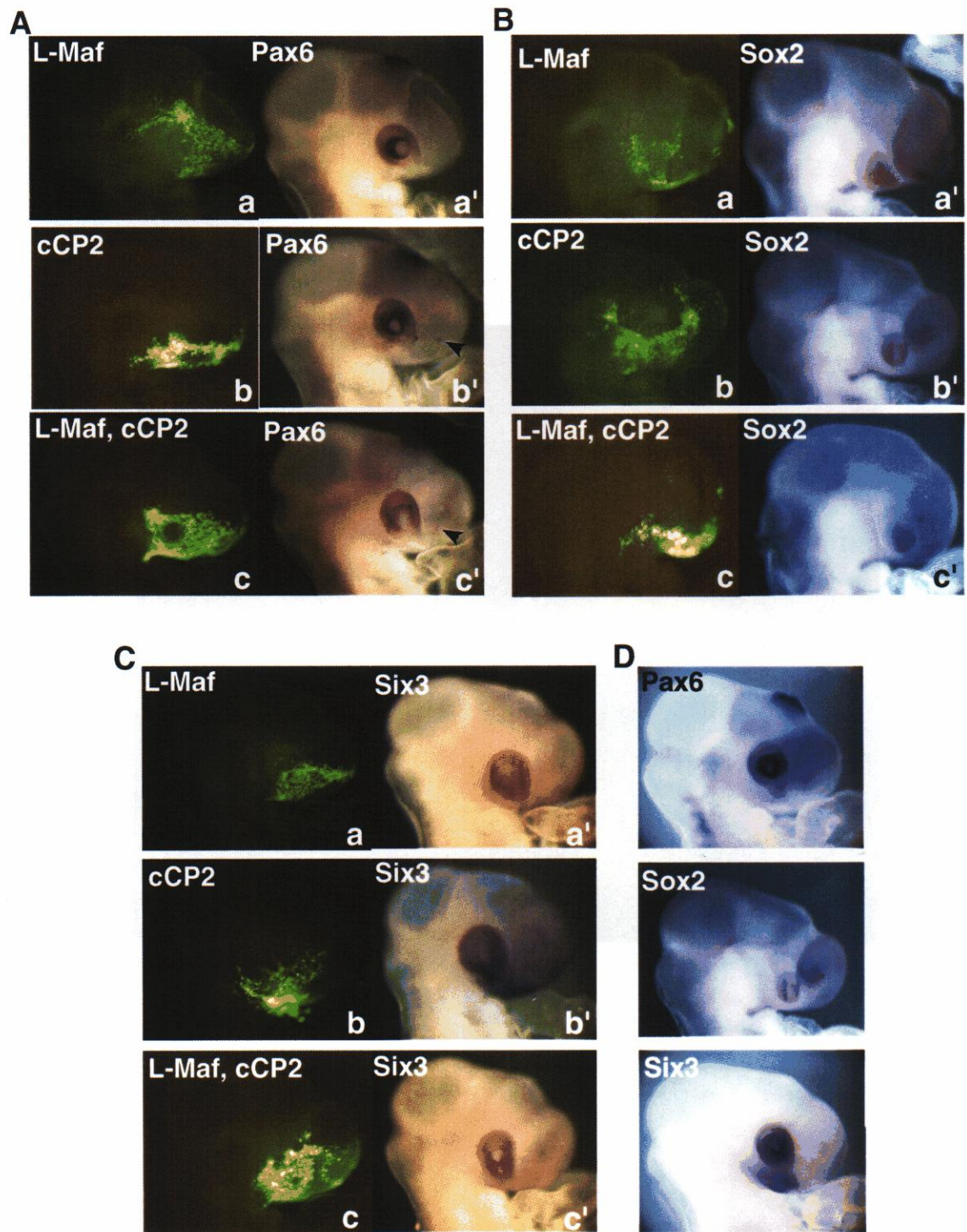


図 30 cCP2 が水晶体形成に関わる遺伝子の発現に与える影響

エレクトロポレーション法により、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉の水晶体領域の周囲に cCP2 および L-Maf を単独もしくは共に導入してから 24 時間後、ホルマウント in situ ハイブリダイゼーションにより Pax6、Sox2、および Six3 mRNA の発現を調べた (A-C)。cCP2 は Sox2、Six3 の発現に影響しなかったが (B, C)、異所的な Pax6 の発現を誘導していた (Ab', c', 矢頭)。(D) コントロール胚の Pax6、Sox2 および Six3 の発現。

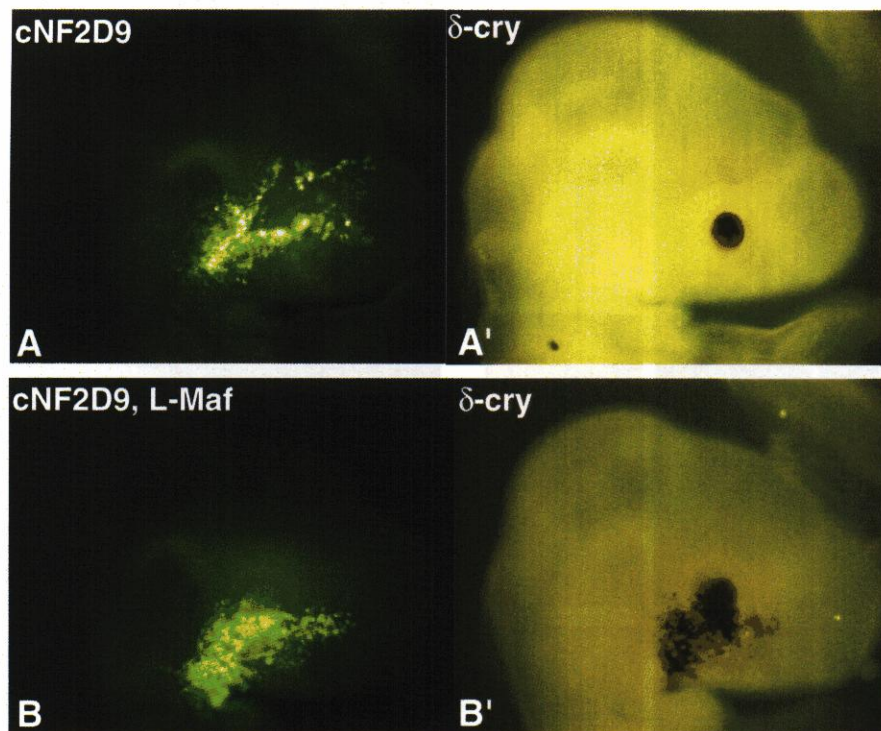


図 31 個体における cNF2d9 の強制発現

エレクトロポレーション法により、水晶体プラコードが形成される時期の頭部外胚葉に cNF2d9 および L-Maf を導入してから 24 時間後、ホルマウント抗体染色により  $\delta$ -クリスタリンの発現を調べた。cNF2d9 は内在性および L-Maf による異所的な  $\delta$ -クリスタリンの発現には影響を及ぼさなかった (A', B')。



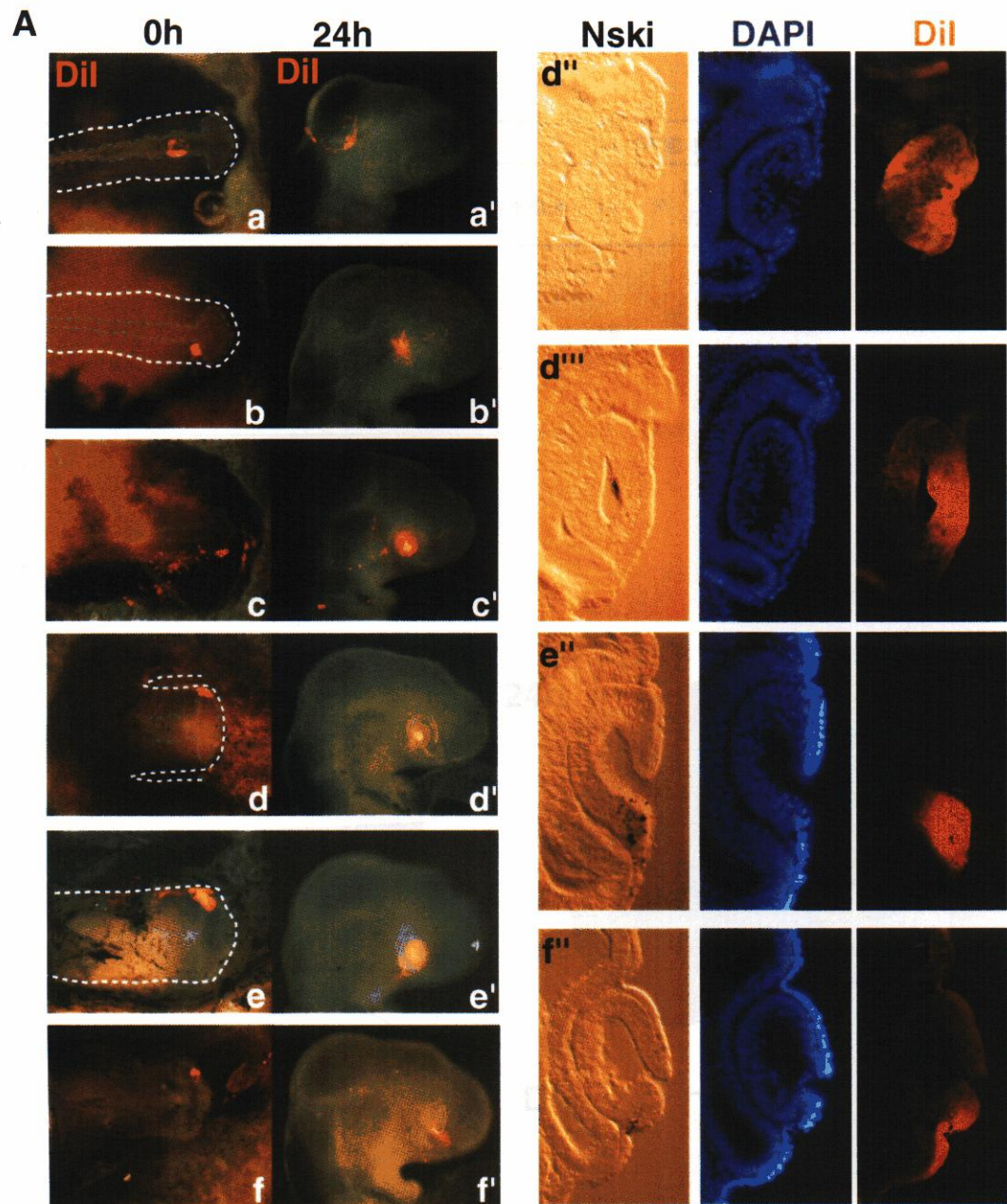


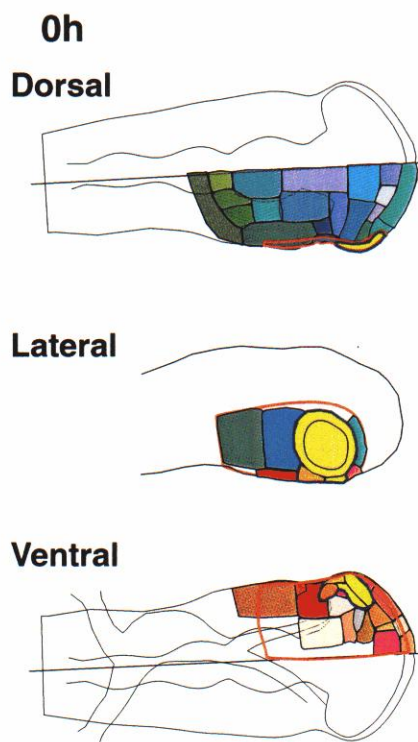
図 32 腹側頭部外胚葉も水晶体形成に参加する。

(A) 水晶体プラコードが形成される時期 (ステージ9~11) のニワトリ胚頭部外胚葉の様々な領域を DiI により標識して写真を撮影後 (a-f)、24 時間発生を進行させた (a'-f)。d-f は腹側頭部外胚葉を標識するために胚の前側を後方へ振り返らせている。この操作により、腹側外胚葉の一部の領域が将来水晶体になることが確認された (d', e', f)。またこれら水晶体の切片像 (d''-f'') により、腹側外胚葉由来の細胞が水晶体の様々な領域を構成することが判明した。(B) 水晶体領域、L-Maf により  $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導される領域、およびその他の領域を DiI で標識してから 24 時間後、各領域で DiI が検出された個体数を表に示した。(C) 頭部外胚葉の運命予定図。DiI で標識した時点の領域と 24 時間後の領域を同色で示した。茶色の線は L-Maf の強制発現により、 $\delta$ -クリスタリンの発現が誘導される領域を示す。(D) (C) の図をもとに腹側頭部外胚葉細胞の水晶体領域への移動経路を予測した。

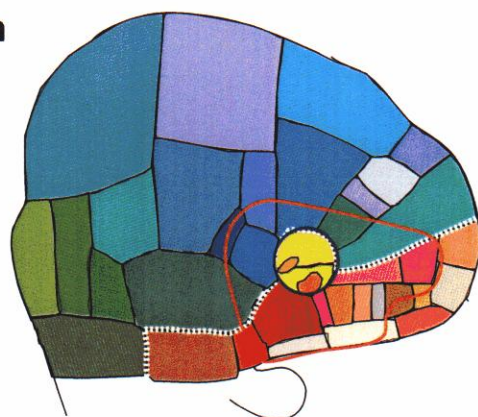
**B** Dil で標識した部位の 24 時間後の移動先

水晶体プラコード形成時期 Dil で標識した部位	n=133	Dil で標識された部位 (24 時間培養後)		
		水晶体プラコード	L-Maf により $\delta$ -クリスタリン の発現が誘導される領域	その他
水晶体プラコード	12	12	0	0
L-Maf により $\delta$ -クリスタリン の発現が誘導される領域 (腹側)	82 (64)	19 (19)	62 (45)	1 (0)
その他	39	0	3	36

**C**



24h



**D**

