

論文内容の要旨

申請者氏名 島田 直子

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を理解する上で有用な研究対象となる。当研究室では、ニワトリ α 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、 α CE1、 α CE2 に結合する転写因子 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特異的に発現し、クリスタリン等の種々の水晶体特異的な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 は水晶体形成に重要な役割を果たすことが予想される。cCP2 は、様々な遺伝子の組織特異的な発現制御に関わる CP2 ファミリーに属し、多くの組織において発現する。培養系において cCP2 は、 α CE1 を介した水晶体細胞特異的な転写活性化能を示す。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. δ -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

個体において L-Maf による水晶体特異的な遺伝子の誘導能を検討するため、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。その結果、水晶体初期分化マーカーである δ -クリスタリンの発現は、水晶体周囲の限局した領域でのみ誘導された。次に、この発現の領域特異性に対する説明として、 δ -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。その結果、Sox2 を用いた場合では頭部外胚葉の全域で強い δ -クリスタリンの発現が誘導された。また、これらは協調して δ -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 δ -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示唆された。

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、cCP2 と L-Maf が協調して α A-クリスタリンエンハンサー (α 244) を活性化できるかどうかを in ovo レポーターアッセイにより検討したところ、両者による協調作用が確認された。また cCP2 を 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 δ -クリスタリンの発現抑制が観察された。一方、cCP2 による α CE1 を連結したレポーター遺伝子の転写活性化は水晶体では検出されなかった。従って、個体において cCP2 が正常に機能するには 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。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 島田 直子

発生学とは、単一の受精卵より多彩な細胞が分化し、多様な組織の集合体としての器官を形成し、独立した個体へと変遷する過程を研究する学問である。分子生物学的手法を用いる現代発生生物学においても、その根幹に細胞分化・器官形成のメカニズムの探究があることは言うまでもない。水晶体形成はこのような発生現象を研究する上で非常に優れた系である。

本論文で申請者は水晶体形成の制御因子としての **cCP2**、**Sox2** および **L-Maf** の機能と、その標的遺伝子であるクリスタリンの発現制御機構に着目している。**electroporation** 法を用いた *in vitro* の解析の結果、**cCP2** と **L-Maf**、**Sox2** と **L-Maf** が協調的に働いてそれぞれ α クリスタリンと γ クリスタリンを活性化することを示した。特に **Sox2** と **L-Maf** の強調作用は全くの新規の発見であり、クリスタリンの発現制御のみならず細胞分化そのものにも影響が見られたことと合わせ、複数の異なる転写因子の組み合わせによる細胞運命の決定という概念を証明した点で評価できる。**Sox2** に代表される **HMG box** タンパク質と **L-Maf** に代表されるロイシンジッパー型の転写因子がどのように相互作用するのか、今後の研究の展開に興味を持たれる。また、**Sox** は予定水晶体領域のいわゆる **competence** の決定に関与していることが知られていたが、本論文における研究で **specification** や **differentiation** といった水晶体形成のより後期のプロセスにも深く関与していることが示唆された。多機能性を持つ因子の解析に際しては、マウスにおけるノックアウト法などの遺伝子の活性を全て破壊する方法ではなく、生体内における **gain-of-function** 型の実験の方がより深い理解を得られることのよい例であろう。

本論文における知見により、**cCP2**、**Sox2**、**L-Maf** といった転写因子群が、互いに密接に作用しあって水晶体形成という複雑な現象を巧妙に制御していることが明らかとなり、器官形成の分子基盤を明らかにしたという点で当該分野における貢献度は大きい。またこのことは、高等動物の器官形成において今まで独立に機能すると考えられがちであった遺伝子発現制御因子間の相互作用が、実際には標的遺伝子の発現領域の決定や分化のタイミングに重要な意味を持つ可能性を示唆しており、従来の解釈の再考を促すという点においても評価できる。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。