

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所 属 (主指導教官)	バイオサイエンス研究科分子生物学専攻(安田國雄教授)		
氏 名	百瀬 剛	提 出	平成 11年 1月 7日
題 目	ニワトリ網膜、水晶体の形態形成の過程における胚誘導と ホメオボックス遺伝子Sgx-1の機能の解析		
<p>要旨</p> <p>胚発生の過程で細胞の分化や形態形成は胚誘導と呼ばれる組織間の相互作用が大きな役割を果たしている。眼(水晶体、網膜)の発生の過程に誘導現象が深く関わっていることが古くから知られており、眼の発生は胚誘導を解析するよいモデルシステムである。しかしながら眼における胚誘導を転写因子や細胞外シグナルの相互作用のレベルで明らかにする研究はほとんどされていない。</p> <p>第一部では眼における胚誘導の分子的機構を明らかにするために必要なニワトリ胚への遺伝子導入法“マイクロエレクトロポレーション法”の開発について述べる。これまで報告されてきた<i>in ovo</i>エレクトロポレーション法では比較的大きな白金電極を用いていたのに対し、本法では非常に微少なタンゲステン針を電極とし、標的組織周辺に挿入することによって、ニワトリ胚の特定の領域を標的として、高い効率で異所的な遺伝子発現を得ることを可能にした。個体毎の導入の再現性が高まったとともに、標的内で遺伝子を受け取った細胞の割合が飛躍的に高まった。限局した電場をかけることによって胚全体への毒性を減らし、生存率を上げることができた。ニワトリを用いる利点である胚の外科的な取り扱いと組み合わせることによって、発生の分子的メカニズムを解明するための強力で汎用的なツールになることが期待される。</p>			

第二部では眼の主要な構成組織である網膜と水晶体の形態形成の制御機構を明らかにしようと試みる。本研究でニワトリ眼cDNAライブラリからクローニングされたホメオボックス遺伝子Sgx-1の発現は水晶体プラコード、眼杯の内層において肥厚、陥入と時間的、空間的に高い関連を示した。

Sgx-1遺伝子をエレクトロポレーション法で眼胞周辺の予定水晶体外胚葉に導入したところ、水晶体胞と眼杯の陥入が重複して観察された。異所的な眼胞と水晶体胞はそれぞれ神経性網膜特異的なホメオボックス遺伝子Rxと水晶体に特異的に発現するL-mafや δ -crystallinを発現していた。Sgx-1を強制発現した細胞の周辺にこれらの組織の異所的な形成が誘導されていたことより、Sgx-1は細胞非自律的に水晶体や網膜の形態形成を制御することが示唆される。おそらく転写因子であるSgx-1の下流に眼杯形成の誘導シグナルが働いていると予想される。またSgx-1を導入した細胞そのものは δ -crystallin(水晶体繊維細胞に局限して発現する)を発現しておらず、水晶体の繊維分化が抑制されていた。Sgx-1は胚発生の過程で繊維細胞では発現しておらず、正常な胚発生の過程で水晶体上皮細胞を維持する機能があると示唆される。

水晶体を取り除く実験によって、眼胞の陥入と水晶体が必要であるが網膜の初期の分化運命には水晶体が必要でないことが明らかになった。Sgx-1を発現する表皮外胚葉は、水晶体プラコードの代わりに眼胞の陥入を引き起こすことができることから、水晶体におけるSgx-1とその下流に存在する誘導シグナルカスケードが眼杯の陥入を引き起こすことが示唆される。

Sgx-1の眼胞における発現はRx等とともに眼胞で発現する網膜形成イニシエーターと考えられるFGF-8によって誘導され、水晶体の存在には非依存的であるので、FGF-8によって誘導された眼胞におけるSgx-1とその下流の因子が水晶体の形成を誘導するとともに、水晶体におけるSgx-1が逆に眼杯の陥入を誘導するというモデルを提唱する。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 百瀬 剛

第一部では、眼における胚誘導の分子的機構を明らかにするために必要なニワトリ胚への遺伝子導入法“マイクロエレクトロポレーション法”の開発について述べている。これまで報告されてきた*in ovo*エレクトロポレーション法では比較的大きな白金電極を用いていたが、本法では非常に微少なタングステン針を電極とし、標的組織周辺に挿入することによって、ニワトリ胚の特定の領域に高い効率で異所的な遺伝子発現を得ることを可能にした。個体毎の導入場所の再現性向上とともに、標的内で遺伝子を受け取った細胞の割合が飛躍的に高まり、限局した電場をかけることによって胚全体への毒性を減らし、生存率を上げている。胚の外科的な取り扱いと組み合わせることによって、発生分子的メカニズムを解明するための強力で汎用的なツールになることが期待できる。

第二部では、眼の主要な構成組織である網膜と水晶体の形態形成の制御機構を明らかにしようと試みている。ニワトリ眼cDNAライブラリからクローニングされたホメオボックス遺伝子Sgx-1の発現は、水晶体プラコード、眼杯の内層において肥厚、陥入と時間的、空間的に高い関連を示した。

Sgx-1遺伝子をエレクトロポレーション法で眼胞周辺の予定水晶体外胚葉に導入したところ、水晶体胞と眼杯の陥入が重複して観察された。異所的な眼胞と水晶体胞はそれぞれ神経性網膜特異的なホメオボックス遺伝子Rxと水晶体に特異的に発現するL-mafや δ -crystallinを発現していた。Sgx-1を強制発現した細胞の周辺にこれらの組織の異所的な形成が誘導されていたことより、Sgx-1は細胞非自律的に水晶体や網膜の形態形成を制御することが示唆される。またSgx-1を導入した細胞そのものは δ -crystallinを発現せず、水晶体の繊維分化が抑制されていた。Sgx-1は胚発生の過程で繊維細胞では発現していないので、正常な胚発生の過程で水晶体上皮細胞を維持する機能があると示唆される。

水晶体を取り除く実験によって、眼胞の陥入に水晶体は必要であるが、網膜の初期の分化運命には水晶体が必要でないことが明らかにしている。Sgx-1を発現する表皮外胚葉は、水晶体プラコードの代わりに眼胞の陥入を引き起こすことができることから、水晶体におけるSgx-1とその下流に存在する誘導シグナルカスケードが眼杯の陥入を引き起こすことが示唆される。Sgx-1の眼胞における発現はRx等とともに眼胞で発現する網膜形成イニシエーターと考えられるFGF-8によって誘導され、水晶体の存在には非依存性であるので、FGF-8によって誘導された眼胞におけるSgx-1とその下流の因子が水晶体の形成を誘導するとともに、水晶体におけるSgx-1が逆に眼杯の陥入を誘導するというモデルを提唱している。

以上のように、本論文はニワトリ胚への遺伝子導入法を開発し、この方法を用いて眼形成に関わるSgx-1遺伝子の機能を解析したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。