

氏名(本籍)	かわ うち しまこ 川内紫真子(広島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第1660号
学位授与年月日	平成12年10月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Regulation of Lens Fiber Cell Differentiation by Transcription Factor c-Maf (c-Maf転写因子のマウス水晶体形成における発現と機能)
主査	筑波大学教授 博士(医学) 榎正幸
副査	筑波大学教授 医学博士 木村幸子
副査	筑波大学教授 医学博士 三輪正直
副査	筑波大学助教授 医学博士 渋谷彰

論文の内容の要旨

(目的)

水晶体は未分化で分裂能を有する上皮細胞と、それが最終分化した線維細胞の2種類の細胞群から構成される。水晶体特異的なクリスタリン遺伝子群の組織特異的な発現制御を行うエンハンサーエレメントに結合する因子として、塩基性ロイシンジッパー型の転写因子である Maf ファミリーに属する L-Maf がニワトリで単離された。L-Maf は、水晶体で特異的に発現し、網膜初代培養細胞に導入するとクリスタリン蛋白質群の発現を促進する事が知られている。従って、水晶体形成過程は Maf 転写因子による細胞分化・器官形成の制御機構を研究する上で格好のモデル系となる。本研究では、遺伝学的解析を使う事ができるマウスを用いて、マウスの水晶体発生過程において特異的に発現する Maf 因子を同定し、その働きを個体レベルで包括的に理解することを目的とした。

(対象と方法)

水晶体で特異的に発現する Maf 因子を単離するため、特異的な縮合プライマーを設計し、マウス水晶体の mRNA を鋳型とした RT-PCR 解析を行った。得られた Maf 遺伝子群の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて検討した。遺伝子欠損マウス作成のための遺伝子は、マウス 129svJ 由来のゲノムライブラリーより単離し、*LacZ* 遺伝子挿入型のノックインベクターを構築した。ES細胞とそれから派生するマウスの遺伝子型は PCR法とサザンブロット法により決定した。*c-maf* 遺伝子座に挿入した *LacZ* 活性は、X-gal を基質として検出した。得られた個体に対し、組織免疫染色法と RT-PCR 法を用いてクリスタリン蛋白質と遺伝子の発現を解析した。

(結果)

1) マウス水晶体に発現する Maf 遺伝子の探索

RT-PCR法を用い、マウス水晶体に発現する Maf として、c-Maf, MafB, Nrl の3種類を得た。*in situ* ハイブリダイゼーションを行い、c-Maf が水晶体線維細胞に、MafB が水晶体上皮細胞に特異的に発現することを発見した。そこで、c-Maf がマウス水晶体形成過程に重要であると考え、*c-maf* 遺伝子欠損マウスの作製に着手した。

2) *c-maf* 遺伝子欠損マウス作製

マウスゲノムライブラリーより *c-maf* 遺伝子を単離し、その構造を決定した。*c-maf* はイントロンを持たない遺

伝子である事が判明したので、その翻訳領域を*LacZ*遺伝子と置き換えたベクターを構築した。このベクターをES細胞に導入し、5クローンが得られたので、それらに由来するキメラマウスを作製した。

3) *c-maf*ヘテロ遺伝子型マウスにおける*LacZ*発現とホモ遺伝子型マウスの表現型の解析

*c-maf*ヘテロ遺伝子型のマウスにおける*LacZ*活性を解析した結果、*c-Maf*の発現部位は水晶体線維細胞に限局しており、上皮細胞では全く発現が認められなかった。

*c-maf*ホモ欠損マウスの水晶体は空胞を有し、大きさも野生型と比べ、体積にして1/8から1/10と非常に小さかった。胎児期に遡って解析した結果、*c-maf*ホモ欠損マウスでは、水晶体線維細胞の伸長が阻害され、成長できない事が明らかとなった。

4) *c-maf*ホモ欠損マウス水晶体でのクリスタリン遺伝子群の発現

*c-maf*ホモ欠損新生児マウスの水晶体に対して、各クリスタリン蛋白質に対するモノクローナル抗体を用いて組織免疫染色を行った結果、各クリスタリンの発現は一樣に著しく減少していることが解った。次に、各クリスタリン遺伝子のRT-PCR解析を行った結果、全てのクリスタリンのmRNAが著しく減少している事、特に γ -クリスタリン遺伝子の発現が全く検出されない事が明らかになった。

(考察と結語)

以上の実験から次の2点が結論された。

- (1) *c-maf*遺伝子は水晶体線維細胞特異的に、*MafB*は水晶体上皮細胞特異的にその発現が認められた。
- (2) *c-maf*欠損マウスの水晶体ではクリスタリンの発現が著しく減食し、線維細胞伸長が阻害されており、その結果、水晶体が正常に形成されない。 γ -クリスタリン遺伝子のフレームシフト変異マウスでは、*c-maf*ホモ欠損マウスと同様に線維細胞の伸長が阻害され、空胞を有した水晶体が認められた。 γ -クリスタリン遺伝子のエンハンサーエレメントには*c-Maf*が結合しうるMARE配列が存在することから考えて、*c-maf*ホモ欠損の表現型はクリスタリン遺伝子群の発現減少に起因している可能性が高いと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

マウスの水晶体形成過程における転写因子*c-Maf*の関与を明らかにした論文である。マウス水晶体に特異的に発現する*Maf*遺伝子群の同定から*c-maf*遺伝子の個体レベルでの解析までを行っている。解析の結果、*c-maf*ノックアウトマウスでは、クリスタリン遺伝子の発現が減少している事、水晶体線維細胞の伸長が起こらない為に水晶体が正常に形成できない事が明らかになった。 γ -クリスタリン遺伝子にフレームシフト変異を持つマウスでも類似の表現型が観察される事から、*c-maf*遺伝子欠損の表現型は、クリスタリン遺伝子発現が失われた為に引き起こされた可能性が高い事が考えられる。

マウスの水晶体に発現する遺伝子の同定から始め、ノックアウトマウス作成による遺伝子機能解析までを一環して行っており、遺伝子の解析も詳細に論理的に進められている点が大いに評価できる。しかしながら、*c-maf*遺伝子の水晶体分化における役割や他の転写因子との関連、さらにノックアウトマウスが死亡する原因などに関して興味深い未解決の問題が多く残されており、今後の更なる解析が期待される。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。