

氏名 飯尾明生

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第90号

学位授与の日付 平成6年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻
学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 色素上皮細胞特異的遺伝子のニワトリの個体発生における発現とその機能の研究

論文審査委員 主査教授 江口吾朗
教授 鈴木義昭
教授 長濱嘉孝

論文内容の要旨

色素上皮細胞特異的遺伝子のニワトリの個体発生における発現様式とその機能の研究

脊椎動物の眼の色素上皮細胞は、細胞外基質に接着して敷石状の単層上皮を形成し分化形質を安定に維持している。この細胞種は、培養条件下でも生体内と等価の色素上皮を再構築し本来の分化形質を容易に発現し、それを維持することができる。一方、このような色素上皮細胞は長期間に亘って継代培養したり特定の培養条件下で維持するとレンズ細胞に分化転換する。申請者は、このような色素上皮細胞がいかにしてその分化形質を安定に維持しうるかを探究することを最終的な目標とし、その制御に関与すると期待される遺伝子pP344の、色素上皮細胞の分化とその安定化あるいはレンズ細胞への分化転換の制御における役割とその遺伝子産物の生化学的性質を明らかにしようと試みた。

分化した色素上皮細胞でのみ発現し脱分化細胞や分化転換したレンズ細胞では発現しない遺伝子として単離されたpP344遺伝子は、メラノソーム基質タンパク質をコードするMMP115遺伝子やチロシナーゼ遺伝子とは異なり、黒色色素細胞での発現は全く認められず色素顆粒形成とは異なる機能をもつ眼の色素上皮細胞に特異的な遺伝子であることが分かっている。また、予想されるアミノ酸配列からシグナル配列と4カ所のプロテアーゼインヒビター様ドメインをもつ極めてユニークな分子であることが推測されている。

以上の知見を踏まえ、まずはじめにpP344遺伝子の色素上皮細胞における時間的空間的な発現様式を詳細に調べ、色素上皮細胞の分化および分化転換との関係を解析した。材料に用いたニワトリの発生過程の各段階について網膜色素上皮を単離しAGPC法によってRNAを抽出しRT-PCR法によってpP344 mRNA量の変化を調べた。また、メラニン色素を産生しないアルビノウズラを材料にジゴキシゲニン標識RNAプローブを用いたin situハイブリダイゼーションによって発生過程でのpP344遺伝子発現の変化を解析した。その結果、pP344遺伝子の発現は色素上皮細胞の分化の進行とともに増加し、その後一時減少するが羽化を境に再び増加することが分かった。対照のMMP115遺伝子は、胚発生における色素上皮細胞の分化期にはpP344遺伝子とほぼ同様な発現様式を示したが、羽化後には発現量の増加は見られなかった。また、pP344遺伝子は、MMP115遺伝子とは異なり発生を通じて毛様体および虹彩の色素上皮では発現は極めて微弱であり網膜色素上皮特異的であることが分かった。次に分化転換の初期過程に注目し初代培養系における遺伝子発現量の変化を調べた。その結果、pP344 mRNA量は、細胞接着後生体内と同様に細胞の分化に伴って増加する一方、脱分化を促す培養条件では有意な増加は認められずpP344遺伝子の発現が抑制されていることが分かった。

次に、pP344遺伝子産物に特異的な抗体を作製し、pP344遺伝子産物を同定、精製してその生化学的解析を行った。予想されるアミノ酸配列をもとに作製した合成ペプチドをマウス、ウサギに免疫し抗血清を採取した。発現ベクターpMT2を用いてpP344cDNAをクローン化したプラスミドpMT2-344Fを導入して強制発現させたCOS-7細胞の細胞抽出液および培養上清をウエスタンブロット法を用いて調べた結果、細胞抽出液には約60kDa、培養上清には約70kDaのタンパク質が検出された。同様に培養網膜色素上皮細胞で調べたところ、約70kDaのタンパク質が非常に効率良く培養上清に分泌されていることが分かった。

このタンパク質は多様な糖鎖の修飾をうけ、ヘパリンとの親和性を有した等電点約4.2の酸性糖タンパク質であり、イオン交換およびアフィニティークロマトグラフィーによって精製しアミノ酸配列を決定してpP344遺伝子産物であることを確認した。

最後に、pP344タンパク質の機能を推定するために生体内における局在性を調べた。精製pP344タンパク質を免疫して得た抗体価の高い抗体を用いて、眼球の凍結切片に対する間接蛍光抗体法と眼球内成分に対するウェスタンブロット法を行った結果、網膜色素上皮層にのみ特異的にシグナルが検出された。このことから、pP344タンパク質は、通常は細胞外には分泌されず、ある状況下でのみ効率よく分泌されて機能を発揮する分子であると考えられた。

以上の結果から、pP344タンパク質は眼の網膜色素上皮細胞に特異的なプロテアーゼインヒビターであり、分化転換過程を調節するというよりもむしろ網膜色素上皮細胞の分化形質として発揮される機能を担う分子である可能性があると考えられた。これらの成果は眼の内外の生理的障壁、視細胞外節の周期的更新における貪食作用、光量調節などの色素上皮細胞が発現する特異的な機能を分子レベルで解析するための貴重な基礎となるとともにその分化状態の維持及び調節のしくみを解析するためにも重要な基礎知見として学術的意義も大きいと考える。

論文の審査結果の要旨

有尾両生類のイモリ属では、レンズが虹彩色素上皮の分化転換によって完全に再生される。このようなレンズ細胞への分化転換能は、レンズ再生の不能なヒトをも含む脊椎動物の色素上皮細胞に普遍的に保存されていることが示されている。本研究の目的は、色素上皮細胞が特異的に発現し、その産物が同細胞種の機能的な安定化に必須な細胞外基質を蛋白質分解酵素による分解から守ると想定されてきた、pP344遺伝子の発現様式とその機能を明らかにすることにある。

この目的を達成するために、申請者は生体系と細胞培養系を巧みに活用しての適切な方法論によって、研究を展開し、下記の成果を得た。

pP344遺伝子は、発生的由来の等しい虹彩色素上皮及び毛様体色素上皮では全く発現されておらず、網膜色素上皮のみで発現される網膜色素上皮細胞にきわめて特異的な、従来知られていない遺伝子であることをまず明らかにした。次いで、この遺伝子は眼の発生過程で網膜色素上皮の分化の進行を基礎づける発現様式を示し、この細胞種の分化の完了と共にその発現は一時低下するが、眼球形成終了後に再び活性化されることを見出した。さらに、このような成果を踏まえ、困難なpP344遺伝子産物の特異抗体の作出に成功し、それを活用して、この遺伝子がコードする蛋白質の精製を達成した。この蛋白質の化学的性状を調査すると共に、培養網膜色素上皮細胞及び生体系の網膜色素上皮細胞における挙動を解析し、この蛋白質が確かに蛋白質分解酵素阻害活性を有する分泌蛋白質であり、生体内では網膜色素上皮細胞に保持されていることを明らかにした。

これらの成果は、pP344遺伝子産物が網膜色素上皮細胞に特異的なプロテアーゼインヒビターとして、網膜色素上皮細胞の機能維持に不可欠な役割を担う分子であることを強く示唆するものであり、網膜色素上皮細胞の分化状態及び機能調節のしくみを解析するための貴重な基礎知見と位置づけることができる。

以上のように本研究の学術的意義は大きく本論文は学位論文に充分値するものである。