

氏名 水野伸彦

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第215号

学位授与の日付 平成8年3月21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 レンズの発生及び再生の分子生物学的研究

論文審査委員 主査 教授 江口吾朗  
教授 野田昌晴  
教授 鈴木義昭  
教授 長濱嘉孝

## 論文内容の要旨

目的：再生は失われた個体部分が再発生することで、いわば個体の部分的な発生の繰り返しであり、したがって、再生過程は発生過程と同等であると考えられがちである。しかし、特定の組織あるいは器官について、それらの再生が発生と同一の遺伝子発現プログラムによって成立するか否かは全く不明である。本研究の目的は、有尾両生類のレンズ再生に着目し、まずレンズの正常発生と再生との異同を、レンズ細胞特異的遺伝子の発現パターンの観点から比較解析して明らかにし、次に、レンズ再生様式の異なるイモリ (*Cynopus pyrrhogaster*) とアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) について、レンズの発生過程での頭部外胚葉のレンズ誘導源（眼胞）に対する応答能の異同を、眼形成遺伝子と考えられている Pax-6 遺伝子の発現様式の解析を通じて明らかにする事にある。

方法 1：イモリのクリスタリン cDNA を得るために、ニワトリ  $\alpha$  A に対するモノクローナル抗体とニワトリ  $\beta$  B1 クリスタリン cDNA をプローブとして再生レンズの cDNA ライブラリーをスクリーニングした。得られたクローンを、塩基配列解析することにより、イモリの  $\alpha$  A 及び  $\beta$  B1 クリスタリン遺伝子の cDNA を得た。また、 $\gamma$  3 クリスタリン遺伝子の cDNA は既にクローン化されていたものを用いた。これら三種類のクリスタリン cDNA をプローブとしてレンズの正常発生と再生の過程での遺伝子の発現状態の推移を *in situ* ハイブリダイゼーション法で解析した。 $\alpha$  A クリスタリンに関してはゲノミックサザン解析も行った。

方法 2：Pax-6 遺伝子については、イモリ、アフリカツメガエル共に尾芽期の胚から mRNA を抽出した後、RT-PCR 法を行いイモリとアフリカツメガエルの Pax-6 cDNA をそれぞれ単離した。イモリに関しては、尾芽期胚の cDNA ライブラリーを作成して 3' 非翻訳領域を含むクローンのスクリーニングを行った。塩基配列の決定によって Pax-6 遺伝子 cDNA であることを確認した後、これをプローブとして眼発生過程における Pax-6 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法によって調査した。イモリについてはゲノミックサザン解析と RT-PCR 法によって二種類の Pax-6 mRNA の解析をも行った。さらに、成体イモリ眼球から背側、腹側虹彩色素上皮及び網膜より mRNA を抽出し RT-PCR 法により Pax-6 遺伝子の発現を調査した。

結果：イモリレンズ正常発生過程における  $\alpha$  A、 $\beta$  B1 そして  $\gamma$  3 クリスタリン遺伝子の発現は、レンズの再生段階 V（レンズ胞形成期）に三種類とも同時にレンズ胞の後極部分に発現が認められた。発生が進行すると、 $\beta$  B1 クリスタリン遺伝子はレンズ上皮においても発現が認められるようになった。レンズ繊維における三種類のクリスタリン遺伝子の発現は、一次レンズ繊維より次第に二次レンズ繊維へと発現場所が移動していった。レンズ再生時における  $\alpha$  A、 $\beta$  B1 そして  $\gamma$  3 クリスタリン遺伝子の発現は、レンズの再生段階 IV（再生レンズ胞形成期）のレンズ胞先端部で同時に検出できた。 $\beta$  B1 及び  $\gamma$  3 クリスタリン遺伝子のレンズの再生過程での発現は発生過程でのそれと同一であったが、 $\alpha$  A クリスタリン遺伝子のレンズ再生過程での発現様式はレンズの発生過程とは異なり、レンズ繊維のみならずレンズ上皮でも（強い）発現が検出された。また、ゲノミックサザン解析の結果、イモリ  $\alpha$  A クリスタリン遺伝子はシングルコピーであることが示唆された。次に *in situ* ハイブリダイゼーション法によりイモリ、アフリカツメガエルの眼発生過程における Pax-6 遺伝子の発現を調べてみると、共に初期神経胚の頭部神経、表皮外胚葉領域において発

現が観察された。予定レンズ領域を含むと考えられる表皮外胚葉におけるPax-6遺伝子の発現は、イモリでは眼胞が表皮外胚葉と接する初期尾芽胚であるのに対し、アフリカツメガエルでは眼胞が表皮外胚葉に近接するかなり以前の後期神経胚であった。発生が進行すると、両種とも眼胞に接した表皮外胚葉と眼胞に発現が認められた。レンズが形成されてくると、Pax-6遺伝子は、レンズ、網膜、角膜に発現が見られた。成熟したイモリの眼におけるPax-6遺伝子の発現は、生体内においてレンズを形成できる背側虹彩色素上皮、レンズを形成できない腹側虹彩色素上皮及び網膜において確認できた。イモリのように虹彩色素上皮からのレンズ再生は不可能であるが、幼生期でのみ未分化な角膜上皮内層からレンズが再生するアフリカツメガエルでは、その幼生のかなり早い時期においても角膜上皮内層でのPax-6遺伝子の発現は観察されなかった。

以上のことより、レンズの再生過程での遺伝子発現は、基本的には正常なレンズの発生過程とよく似ているが、少なくとも $\alpha$ Aクリスタリン遺伝子に関しては、明らかな違いがあること、レンズの発生や再生様式の異なるイモリとアフリカツメガエルにおいてPax-6遺伝子の発現様式が異なること、しかし、Pax-6遺伝子の発現とレンズ形成能の間に相関が見られることが明らかとなった。本研究の結果はイモリとアフリカツメガエルのレンズの発生及び再生様式の差異は言うまでもなく、レンズ再生の遺伝子的基礎を解明する上で不可欠な基礎的知見であるのみならず、再生現象を一般的に考察する上でも意義深いと考えられる。

## 審査結果の要旨

本論文の内容は、イモリのレンズの発生及び再生のそれぞれの過程をレンズ特異的遺伝子の発現制御の視点から比較検討し、その異同を明らかにすると共に、レンズの再生様式の異なるイモリとアフリカツメガエルの発生系について、頭部外胚葉から形成されるレンズの発生様式を、眼形成を支配していると考えられているPax6遺伝子の発現を比較解析して相違点とその意義を明らかにすることを目的とする研究である。

イモリでは、色素上皮細胞の分化転換によって虹彩から完全なレンズが再生される。所属研究室ですでにクローン化されていたイモリの $\gamma$ -クリスタリンcDNAに加え、イモリのレンズのcDNAライブラリーから $\alpha$ -、 $\beta$ -クリスタリンcDNAをクローン化し、これらレンズが特異的に発現する主要なクリスタリン分子種のcDNAをプローブとするin situ-hybridization法によって、レンズの発生及び再生過程における各クリスタリン遺伝子の発現様態を詳細に比較解析した。その結果、 $\beta$ -クリスタリンと $\gamma$ -クリスタリンの各遺伝子の発現様態は、基本的にレンズの発生と再生とで共通していたが、 $\alpha$ -クリスタリン遺伝子は、発生過程ではレンズ上皮で発現されることがないにも拘らず、再生の場合はレンズ上皮で強く発現されることを明らかにし、再生は発生の単純な繰り返しでないことを遺伝子のレベルでイモリのレンズ再生についてはじめて示した。加えて、眼の形成の支配遺伝子と考えられているPax6遺伝子に着目し、イモリとアフリカツメガエルのPax6遺伝子cDNAをそれぞれ新たにクローン化し、両種には共に2種のPax6遺伝子が存在することを確認した上で、その発現をやはり、レンズの発生と再生とについて比較し、その発現様式に差のないことから、 $\alpha$ -クリスタリン遺伝子の発現調節はPax6遺伝子に支配されていないことを明らかにした。

次に、虹彩色素上皮細胞からレンズを再生するイモリと幼生期のみで角膜上皮からレンズを再生するアフリカツメガエルの眼の発生過程についてPax6遺伝子の発現様式を調べた。その結果、アフリカツメガエルでは神経胚中期で将来のレンズ形成域を含む側頭部外胚葉でPax6遺伝子は発現され、発生の進行と共にその発現が次第にレンズ形成域に収斂するのに対し、イモリでは早期胚の表皮外胚葉での発現は認められず、頭部表皮外胚葉が眼胞と近接してはじめて、そのレンズ形成域で発現されることが明らかとなった。この結果は、イモリでは、外胚葉のレンズ形成が眼胞の誘導作用に依存するのに対し、アフリカツメガエルでは、表皮外胚葉のレンズ形成能は発生の早期から外胚葉側で発生の進行と共に徐々に決定づけられていくことを示す。本研究によって外胚葉のレンズ形成能の決定過程は両種で基本的な差異のあることが明らかにされた。

以上のごとく、本論文の研究は、組織や器官の再生はそれらの発生過程の繰り返しでないことを遺伝子のレベルで始めて明解に示すと共に、眼の発生に基礎づけられたレンズの発生及び再生の遺伝子機構を解明するのに非常に有用な遺伝子的基礎を与えたものとして、その学術的意義は重く、理学博士の学位を取得するに足るものである。

試験結果については、提出された博士学位論文の内容を口頭発表させ、質疑応答を重ねて、研究方法の妥当性をはじめ、研究内容及び成果の独創性、学術的意義等々を詳細に審査検討した。また、ことに動物の発生及び再生について一般的な学識及び英語の能力を審査した。その結果、申請者の博士学位論文は理学博士を取得するに足る内容と価値ある研

究論文と認定し、申請者は今後、独立した研究者として研究をおこなうために必要な学識と英語力を備えていると判定した。