

氏名 澤 田 佳一郎

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大乙第16号

学位授与の日付 平成 8 年 3 月 2 1 日

学位授与の要件 生命科学研究科

学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目 ニワトリ水晶体繊維細胞分化における遺伝子発現の研究

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 鈴 木 義 昭

教 授 江 口 吾 朗

教 授 長 濱 嘉 孝

教 授 堀 内 嵩

助教授 児 玉 隆 治

## 論文内容の要旨

ニワトリ水晶体は構造上、水晶体上皮部と繊維部とに大別される。ニワトリ水晶体繊維部を構成するタンパク質で最も多いのはクリスタリンとよばれる水晶体特異的な一群の水溶性タンパク質である。鳥類のクリスタリンは $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ の3つのクラスに分類され、それぞれがさらにサブクラスを持っている。ニワトリでは2種の $\alpha$ クリスタリン( $\alpha A$ と $\beta B$ )、7種の $\beta$ クリスタリン、および2種の $\delta$ クリスタリンの存在が知られている。他方、非水溶性のタンパク質としては、水晶体特異的な細胞骨格の構成成分であるCytoskeletal proteins(CP49、CP95)が知られている。

これまでに多くの水晶体特異的タンパク質の遺伝子の解析がなされており、クリスタリンサブクラス各種のDNA塩基配列も決定されている。またmRNAの解析より、発生中の水晶体中におけるクリスタリン各クラスの分布なども観察されているが、とくに $\beta B1$ クリスタリンの水晶体繊維部での特異的な発現は水晶体上皮細胞から繊維細胞への分化にともなう現象として興味深い。

このような現象の研究に、水晶体上皮細胞の培養系が利用されている。水晶体上皮組織をトリプシンで単細胞にまで解離した後に長期間培養すると、レンズ様体(lentoid body)とよばれる構造が形成される。レンズ様体は水晶体と同様に伸長した細胞群より成り、各種のクリスタリンが存在していることは確かめられており、水晶体繊維細胞分化の*in vitro*での良い再現系と考えられているが、レンズ様体形成過程での水晶体特異的タンパク質の生成の開始時期などについては未だ詳しくは調べられていない。特にこの解離した水晶体上皮細胞の培養系を用いて、水晶体繊維細胞分化のメカニズムを研究するにあたっては、 $\beta B1$ クリスタリンの発現のような生体での繊維細胞分化にともなって起こる現象を再現できるかどうかを検証する必要があると考えられた。

本研究では新たに各クリスタリンクラスあるいはサブクラスに対するモノクローナル抗体を作製し、さらにcDNAを単離することにより、レンズ様体形成過程におけるクリスタリン発現の消長をタンパク質とmRNAの両レベルで観察した。ニワトリ水晶体上皮細胞培養系における水晶体繊維細胞への分化の過程でのクリスタリンの発現様式をノーザンおよびウェスタンブロッティング法で解析したところ、タンパク質、mRNAのいずれの場合も $\beta$ クリスタリンはレンズ様体の形成にともない発現が開始されることが観測された。他のクリスタリン種ではレンズ様体の形成にともないその量は増大するが、発現自体は上皮細胞の状態から既に始まっていた。この事より、 $\beta$ クリスタリンは水晶体繊維細胞に特異的なクリスタリンであり、その発現が水晶体上皮細胞の繊維細胞への分化の指標となることが*in vitro*の系で示された。

つぎに同cDNAライブラリーより水晶体特異的な細胞骨格のタンパク質であるCP49(別名phakinin)のcDNAを単離、解析したところ、その推測されたアミノ酸配列は中間径フィラメントタンパク質の特徴を備えていた。またヘリックス1Bドメインに49アミノ酸の挿入を持つ変異体、CP49insがみつかった。ニワトリ水晶体上皮細胞培養系においてCP49mRNAは $\beta$ クリスタリンのそれと同様にレンズ様体の形成にともない発現が開始されていたが、その発現開始時期は $\beta$ クリスタリンのそれよりもさらに遅れていた。CP49とともに細胞骨格を形成するCP95mRNAについても同様の結果が得られた。これらの遺伝子の発現もまた水晶

体上皮細胞の繊維細胞への分化の指標となると思われた。

水晶体のひとつの特徴として、クリスタリン、細胞骨格タンパク質、膜タンパク質など限られた種類のタンパク質だけが大量に発現されていることがあげられる。そこで、9種の水晶体主要構成タンパク質のcDNAを用いて、ニワトリ水晶体繊維部のcDNAライブラリー中に占めるこれらの割合を調べたところ、約35%の組み換え体がニワトリ水晶体中のタンパク質で最も多い $\delta$ クリスタリンのcDNAを含んでいた。またその他のクリスタリン( $\alpha$ A、 $\alpha$ B、 $\beta$ A3/A1、 $\beta$ B1、 $\beta$ B2クリスタリン)、水晶体特異的細胞骨格タンパク質(CP49、CP95)および膜タンパク質(MP28)のcDNAはライブラリー中で0.5-6%を占めた。これらの水晶体主要構成タンパク質のcDNAは全体でライブラリーの約60%を占めることが明らかになった。

次に、上記の9種以外のタンパク質の水晶体における発現状況を調べるため、96個の組み換え体をライブラリーより無作為に選択し解析した。その内、55個は上記主要構成タンパク質のcDNAを含んでいた。それ以外の組み換え体の内でサブクローニングできた38個のクローンについて、ニワトリ組織(水晶体上皮部、水晶体繊維部、肝臓、および神経性網膜)における発現の検定、cDNAライブラリーに占める割合の確定、および部分的な塩基配列の決定とDNAデータベースを用いたホモロジー検索をおこなった。その結果、ニワトリ水晶体繊維部のcDNAライブラリーの特徴として、ライブラリーの約40%をしめる未知のcDNAの多くは、それぞれが大変低い割合(0.01%-0.09%)で存在しており、house-keepingタンパク質のcDNAも、量、種類ともに少ないことが推測された。ホモロジー検索の結果、これらの微量に存在するcDNA中にいくつかの、細胞分化や細胞状態の変化に関与することの知られているタンパク質のcDNAが含まれていることが明らかになった(V1タンパク質、p23、BBC-1、TSC-22等)。また、塩基配列より予想されるタンパク質構造から、新たなロイシンジッパータンパク質のcDNAが見つかった。このタンパク質は、cAMP-response element binding proteins(CREBs)ファミリーのいくつかの特徴を備えていた。これらの多種類の調節因子候補の存在はクリスタリンなどの主要構成タンパク質各個の独立な発現調節機構を示唆するものかもしれない。

一方、その60%が少数のタンパク質のcDNAに占められているという水晶体繊維部cDNAライブラリーの特徴は、調節因子などの水晶体繊維細胞中に微量に存在するタンパク質のcDNAの検出を容易にすると思われる。今回の部分的な調査から、水晶体繊維部に存在するそれらの非主要構成タンパク質の種類は数千種類と推測されたので、この研究で示された方法を大規模に行うことにより、水晶体繊維部に発現するすべてのタンパク質を網羅することも可能であると思われた。

最終分化細胞に対するこのようなアプローチは遺伝子発現や細胞分化に係わる因子の探索に効果的であると考えられるが、特に水晶体繊維細胞はそのような目的に適した細胞であると思われた。

## 審査結果の要旨

学位論文の査読並びに2月6日の審査会席上での口頭発表に基づき、審査を行った。

澤田氏は、ニワトリ水晶体細胞の分化過程における遺伝子発現制御の研究を行った。上皮細胞培養系における繊維細胞への分化過程を追って、各種クリスタリン遺伝子の発現をmRNAおよびタンパクのレベルで解析し、 $\beta$ クリスタリンが、この過程における良い指標となることを明らかにした。次に、細胞骨格タンパク質CP49およびCP95のcDNAsをクローニング、構造解析を経て、それらの発現を解析し、 $\beta$ クリスタリンより遅れて発現することを明らかにした。さらに、繊維部cDNAライブラリー中の各種のcDNAの構成状況を96クローンについて解析し、その60%は主要構成成分のcDNAsであること、残り38クローン中には、核タンパク質や細胞の状態変化に伴って発現されるもの、並びに未知のものが含まれることを明らかにした。

発表について質疑を行い、適正な解答が得られた。以上の審査により学位授与にふさわしい内容をもつと判定した。

また、学位論文の背景をなす発生・分化に関する知識並びに遺伝子発現制御に関する知識について口頭試問によって審査し、充分なる学力を有すると判断した。

英語力については、発表済の原著論文数編の記述から見て、また現在投稿中の単著論文の英語から見て充分な力を有するものと判定した。