

審査の結果の要旨

氏名 栗田 良

本研究は、眼の発生過程における各組織間の相互作用及び眼の形態形成に關与する新たな分子的基盤を明らかにするため、ゼブラフィッシュをモデル系として用い、(1) 水晶体破壊実験による水晶体の眼の他組織へ及ぼす影響の検討、(2) 神経網膜に発現特異性の高い新規遺伝子のクローニング及びその機能解析、を試みたものであり、下記の結果を得ている。

(1) 水晶体の眼の他組織へ及ぼす影響の検討

1. ゼブラフィッシュ α A-クリスタリン遺伝子をプローブとしてゲノミックライブラリースクリーニングを行い、上流 4.4kb のゲノム断片をクローニングした。この断片の一部と EGFP 遺伝子とをつないだレポーター遺伝子を作製し、ゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションしたところ、水晶体特異的に EGFP の蛍光が検出された。このことから目的とする α A-クリスタリンプロモーターが単離されたことが示された。さらに EGFP を検出する RT-PCR を行った結果、単離した α A-クリスタリンプロモーターは厳密に水晶体特異的に発現を誘導することが示された。
2. 上記の α A-クリスタリンプロモーターの制御下でジフテリア毒素遺伝子を発現させることにより、水晶体の破壊実験を行った。その結果、水晶体の擾乱は、神経網膜の発生・分化に影響を及ぼすことが明らかになった。水晶体を特異的に破壊させた眼の網膜においては、層構造が完全に崩れ、ところどころに死んだ細胞が凝集しているのが観察された。電子顕微鏡解析及び抗体染色を行った結果、神経網膜の各細胞群は本来位置する場所に正しく存在している一方で、神経節細胞の軸索の数が減少し、通常の網膜内ではよく発達している樹状突起群がほとんど観察されないことが明らかとなった。以上のことから水晶体が網膜内の樹状突起形成・伸張に關与していることが示唆された。
3. BrdU の取り込み実験、anti-phospho Histone H3 を用いた抗体染色の結果、網膜の細胞増殖に異常は見られなかった。一方で、アポトーシスを起こし死んでいる細胞は網膜の分化初期では非常に少ないが、分化後期においてはその数が著しく増大することが明らかになった。これまでに得られた知見とこれらのことを合わせて考慮し、水晶体破壊によりもたらされた形態異常の網膜では、各細胞の特異化及び初期分化までの過程は正常に行われているものの、最終分化の過程が阻害されているということが示唆された。

(2) 神経網膜に発現特異性の高い新規遺伝子のクローニング及びその機能解析

4. ゼブラフィッシュの網膜由来ESTデータベースより **unknown** 配列をランダムに選択し、網膜の形態が大きく変化する受精後 24 時間と 48 時間の 2 ステージにおいて、頭部と体部とに分けた RT-PCR を行った。頭部に発現特異性の高いクローンについて、全長クローニング及び詳細な発現パターンの検討を行った結果、受精後 24 時間以降において眼裂部や脳の一部に発現が限局する新規の遺伝子 # 6 1 が単離された。
5. 全長 cDNA の配列解析より、6 1 は N 末端側にロイシンジッパーモチーフ、C 末端側にアクチン結合ドメインを有した新規のアクチン結合タンパク質であることが示唆された。# 6 1 を COS7 細胞に過剰発現させ免疫沈降を行った結果、アクチンの共沈が確認されたことから、# 6 1 のアクチンとの結合能が示された。
6. モルフォリノオリゴ(MO)を用いた # 6 1 のノックダウン胚においては、眼裂部と体部の腹側中胚葉系組織に形態の異常が観察され、さらに網膜や脳の一部で出血を起こす表現型が観察された。眼裂部は正常発生胚と比べて大きく開きその中を通る硝子体血管の形態に異常が観察された。一方で、眼裂部の閉塞・融合、神経網膜の分化及び視神経の投射には顕著な異常は見られなかった。
7. # 6 1 の血管形成に及ぼす影響について検討を行った結果、# 6 1 の発現部位と一致して出血及び血管構造の異常が観察された。このことから、# 6 1 は血管の形態形成に関与していることが示唆された。次に、# 6 1 の血管ネットワーク形成への影響を考察するために、デキストラン-FITC を用いた **angiography** を行った。その結果、出血部位を除く他の部分においては正常にネットワークの形成が確認された。さらに、初期の血管マーカーである Fli-1 の発現にも大きな差は見られなかったことから、# 6 1 は初期の脈管形成及び血管の走行には関与せず、形成された血管構造の維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

以上、本論文はゼブラフィッシュにおいて、水晶体特異的な α A-クリスタリンプロモーターをクローニングし i), その制御下でジフテリア毒素遺伝子を発現させることにより、水晶体の正しい形成が、網膜中の各細胞の最終分化、特に、樹状突起群の形成・伸張に重要な影響を及ぼすことが明らかとした ii)。また本論文において新たに単離された # 6 1 は、これまでに同定された他の血管形成に関わる遺伝子群と比べて眼や脳に特異性が高く、限られた領域 (眼、脳) の血管構造維持に重要な役割を果たしていることが示唆された iii)。これらの研究成果はいずれも眼の発生過程の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。