



平成22年9月14日
独立行政法人 沖縄科学技術研究基盤整備機構

独立行政法人沖縄科学技術研究基盤整備機構 代表研究者 政井一郎博士
白内障治療につながる水晶体の繊維化の仕組みの一端を解明
～かじまやーでもいっぺー見いゆん～

眼球の水晶体は、上皮細胞が分化して繊維化した細胞から構成されています。この繊維化の過程を経て、核、ミトコンドリア、小胞体などの細胞内構造物が無くなり水晶体は透明化します。しかし、水晶体繊維化のメカニズムはまだ明らかになっていません。

この度、沖縄科学技術研究基盤整備機構(OIST) 神経発生ユニット代表研究者の政井博士のグループは、水晶体の繊維化の仕組みの一端を明らかにし、その研究成果が英国の科学誌 **Development** (デベロップメント) 誌に掲載されます。本来透明である水晶体が濁ってくる病気として知られているのが白内障です。白内障の原因はさまざまですが、最も多いのは加齢によるもので、原因の**90**パーセントを占めます。白内障の総患者数は約**128万8千人**にのぼり(平成17年厚生労働省調査)、眼の病気の中では最も多くなっています。現在、手術によって水晶体を取り除く治療が一般に行われております。しかし、白内障の手術後に副作用として、水晶体の白濁(後発白内障)が起きることがあり、手術後の予後の問題になっています。今回政井博士らが明らかにした仕組みは、この後発白内障の発症とも関連しており、その治療法にも貢献することが期待されます。

記

論文掲載雑誌: **Development** (デベロップメント) 137号 (2010年10月1日)
電子版 <http://dev.biologists.org/content/137/19/3257.abstract>

※ 論文の概要については、添付の報道資料をご参照ください。

【本件問合せ先】

独立行政法人 沖縄科学技術研究基盤整備機構 神経発生ユニット 政井一郎博士
電話: 098-929-1372 FAX: 098-929-1380 E-Mail: masai@oist.jp

総務グループ コミュニケーション・広報課 広報担当: 名取 薫
電話: (代表) 098-966-8711 (直通) 098-966-2389 FAX : 098-966-2887
E-mail: kaoru.natori@oist.jp

ユビキチン-プロテアソーム系はゼブラフィッシュにおける
水晶体上皮細胞の増殖および水晶体繊維細胞への分化に必要である
～白内障治療の改善に貢献～

1. 背景

眼球の水晶体は、上皮細胞が分化して繊維化した細胞から構成されています。この繊維化の過程では、核、ミトコンドリア、小胞体などの細胞内構造物が無くなり水晶体は透明化します。しかし、水晶体繊維化のメカニズムはまだ明らかになっていません。

脊椎動物の水晶体の原基は、発生初期に、網膜と接する表皮に誘導されます。その後、水晶体胞として表皮から分離します。水晶体胞では、網膜（後方）側半球に位置する細胞は水晶体繊維細胞として分化し、水晶体繊維のコアを形成します。一方、表皮（前方）側半球の細胞は、水晶体上皮細胞として維持されます。水晶体上皮細胞は幹細胞として増殖しながら、水晶体繊維細胞との境界面（equator）において、新たな水晶体繊維細胞を生み出します。分化途中の水晶体繊維細胞は、水晶体繊維のコアの前後軸の極に向けて突起を伸ばし、扁平に変化することで、古い水晶体繊維のコアを覆っていきます。このように、新しい水晶体繊維細胞がたまねぎの皮のように積み重なることで、水晶体が成長していきます（図1）。上記の特徴から、水晶体は、細胞分化と形態形成のメカニズムを研究する優れたモデルとなっています。また、上記以外に、水晶体細胞が繊維化していく過程で、核、小胞体、ゴルジ体など細胞内器官が消失し、透明化します。赤血球も脱核することは有名ですが、赤血球ではマクロファージが外から核を取り込むことで、脱核することがわかっています。しかし、水晶体は、赤血球とは異なり、細胞自律的に脱核すると考えられています。

脱核の過程では、遺伝情報をコードするDNAが分解されます。マウスでは、水晶体の脱核の際に働くDNA分解酵素として、DNase II-like acid DNase (DLAD ; DNase2b)が同定されています (Nishimoto et al., 2003 Nature 424, 1071-1074.)。DLADは酸性に至適pHを持つDNaseであることから、核がオートファジー（自食）によってリソソームに取り込まれ、DLADの作用で脱核するという可能性が示唆されました。しかし、オートファジーの欠損したAtg5遺伝子の欠損マウスでは、水晶体の脱核は正常に起こることが報告されています (Matsui et al., 2006 BBRC 339, 485-489.)。これらの結果から、オートファジーが脱核に必要な可能性もあり、水晶体の脱核のメカニズムは不明でした。

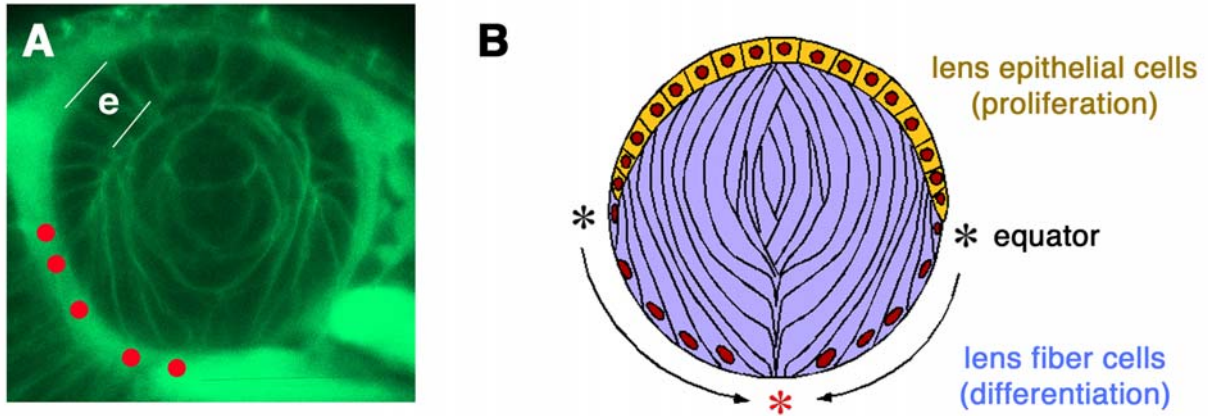


Figure 1

図 1

(A) ゼブラフィッシュ受精後31時間における水晶体を蛍光脂質で染色した像。e: 水晶体上皮細胞。赤丸: 水晶体コア後方に移動している水晶体繊維細胞の基底膜側の仮足。

(B) 水晶体分化の模式図。水晶体の前方（表皮側）に水晶体上皮細胞（黄色）が、後方（網膜側）に水晶体繊維細胞（青色）が位置する。水晶体繊維細胞は次第に扁平になり、核が消失する。新しい水晶体繊維細胞が外側に積み重なっていくことで、水晶体繊維のコアが成長する。水晶体上皮細胞と水晶体繊維細胞の境界（黒の*）は、equatorと呼ばれ、水晶体上皮細胞が水晶体繊維細胞へと分化する場所となっている。水晶体繊維コアの最後方の極（赤の*）はsutureと呼ばれ、向かい合って移動してきた水晶体繊維細胞の基底膜側の仮足が縫合する場所である。

2. 研究成果概要及び本成果の意義

私たちは、水晶体繊維細胞への分化メカニズムを明らかにするために、小型魚類であるゼブラフィッシュを用いて、大規模な突然変異体のスクリーニングを行いました。その結果、水晶体繊維細胞の脱核が正常に進まず、突起伸張など形態変化にも異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体 *volvox (vov)* を発見しました（図2）。

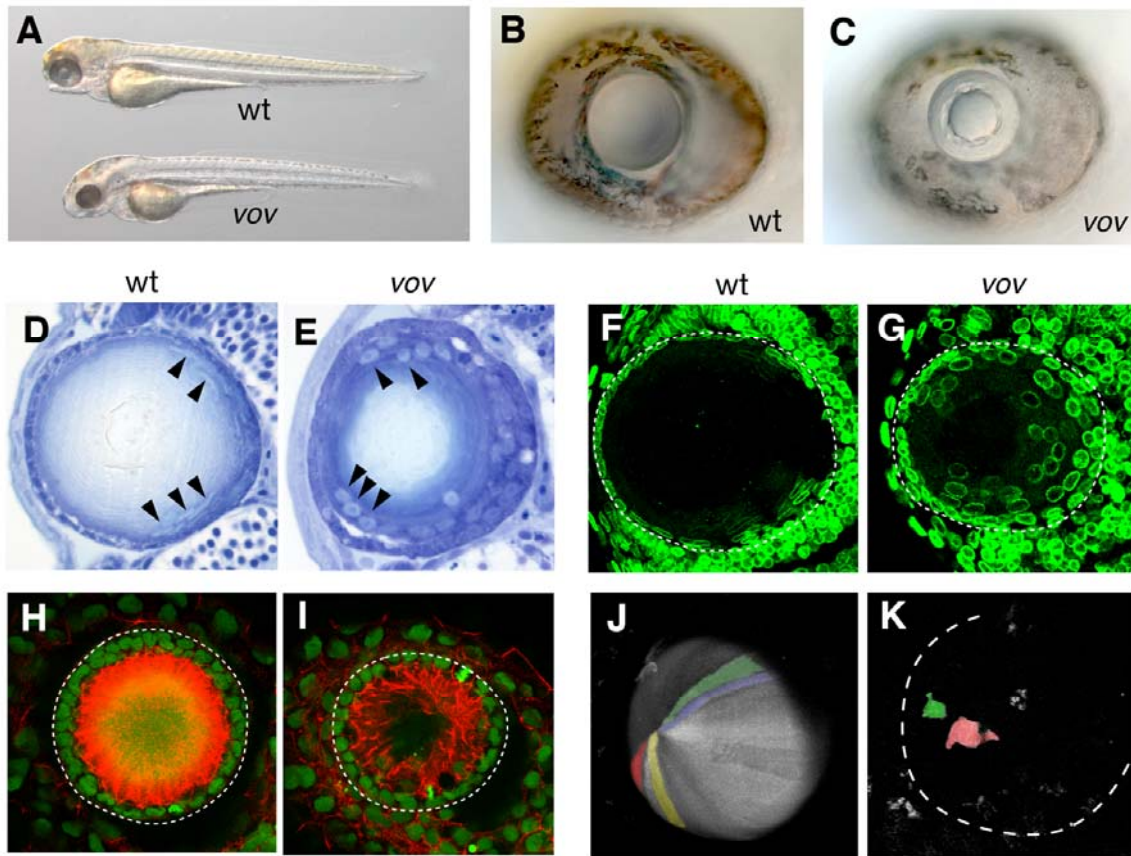


Figure 2

図 2

(A) 受精後72時間における野生型とvov突然変異体。

(B, C) 受精後72時間における野生型(B) とvov突然変異体(C)の水晶体。野生型とは対照的に、vov変異体では水晶体繊維のコアが小さく、そのまわりは不透明である。

(D, E) 受精後72時間における野生型(D) とvov突然変異体(E)の水晶体の切片像。野生型では、水晶体繊維細胞の核が扁平になり、中央部に位置する早く分化した水晶体繊維細胞では消失している。一方、vov変異体では、核は扁平にならず、前方にも位置している。

(F, G) 受精後72時間における野生型(F) とvov突然変異体(G)の水晶体を抗Lamin B1抗体(緑色)で染色した像。抗Lamin B1抗体は核膜を染色する。vov変異体では水晶体コアの中央部でも、核が消失せずに残っている。

(H, I) 受精後72時間における野生型(H) とvov突然変異体(I)の水晶体をファロイジン(赤)で染色した像。ファロイジンはアクチン繊維を染色する。野生型とは対照的に、vov変異体ではアクチン繊維が減少しており、規則的な配向が起こらない。緑色は核を示す。

(J, K) 水晶体繊維細胞でGFPを発現するトランスジェニック系統を遺伝的背景に導入した野生型(J) およびvov突然変異体(K)の水晶体。野生型とは対照的に、vov変異体では、水晶体繊維細胞の伸張が起こらない。

*vov*遺伝子を同定したところ、プロテアソームの調節サブユニットのひとつをコードする*psmd6*遺伝子に変異が起きていました（図3A, B）。プロテアソームは約2500kDaからなる巨大蛋白複合体で、ユビキチンで標識された蛋白質を選択的に分解します。これはユビキチン-プロテアソーム系と呼ばれる蛋白質分解系で、細胞にとって不必要となった蛋白質を除去する以外に、細胞増殖、免疫応答、細胞分化に関わるシグナル伝達などの様々な制御に関わっています。私たちは、*vov*突然変異体では、ユビキチン-プロテアソーム系を介した蛋白分解が低下していることを明らかにしました（図3C）。細胞における蛋白質分解は、選択的に標的蛋白質を分解するユビキチン-プロテアソーム系と、細胞小器官をまとめて分解する非選択的なオートファジーから成っています。私たちの結果から、水晶体の脱核にはユビキチン-プロテアソーム系が必要であることが明らかになりました。

また、私たちは、蛋白質にユビキチンを標識する酵素として、E3ユビキチンリガーゼのひとつであるAnaphase promoting complex/cyclosome (APC/C)が、水晶体の脱核に関わることを明らかにしました。マウスの水晶体上皮細胞の培養系では、Tgf- β がAPC/Cを介して共リプレッサーであるsnoNを分解すること、その結果、snoNの標的であるサイクリン依存性キナーゼインヒビターp57が活性化し、水晶体繊維細胞への分化が促進することが報告されています。私たちの研究から、水晶体の繊維細胞の分化には、APC/Cによる標的蛋白のユビキチン化と、プロテアソームを介した蛋白分解が重要であることが明らかになりました（図3D）。

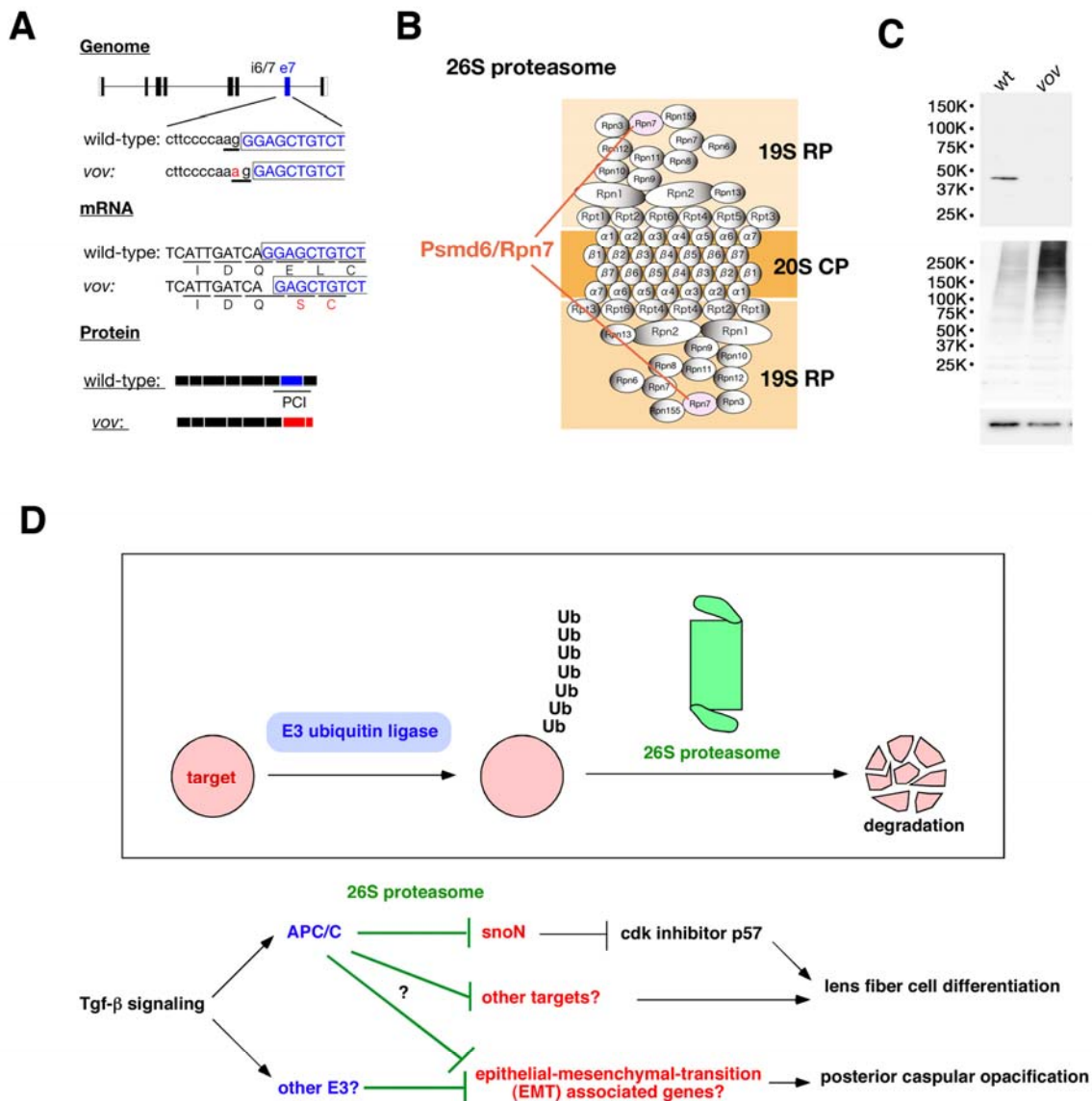


Figure 3

図 3

(A) *vov* 突然変異体では、プロテアソームのサブユニット *psmd6* 遺伝子内のイントロンのアクセプターサイトに突然変異が起きており、*psmd6* 遺伝子のコーディング領域内でフレームシフトが起こる。それにより、*Psm6* のプロテアソーム活性に必要な C 末端側の PCI ドメインがなくなる。

(B) プロテアソームはユビキチンで標識された蛋白質を選択的に分解する巨大蛋白複合体 (26S と呼ばれる) である。26S プロテアソームは中央部の活性部分 (20S catalytic particle, 20S CP) と両端部の調節部分 (19S regulatory particle, 19S RP) に分けることができる。*Psm6* (出芽酵母では *rpn7* と呼ばれる) は 19S RP のサブユニットのひとつである。

(C) 野生型とvov突然変異体における、抗Psm6抗体（上）および抗ポリユビキチン化蛋白質抗体（下）によるウェスタンブロット。vov突然変異体では、Psm6の蛋白質量が減少し、ポリユビキチン化蛋白質の量が増加している。

(D) 水晶体におけるユビキチン-プロテアソーム系の役割。ユビキチン-プロテアソーム系では、E3ユビキチンリガーゼ（青色）によって標的蛋白質（赤色）がポリユビキチン化(Ub)する。プロテアソーム（緑色）はポリユビキチンで標識された蛋白質を分解する（上）。E3ユビキチンリガーゼのひとつであるAPC/Cによるユビキチン化とプロテアソームによる蛋白質分解が、水晶体繊維細胞の分化に必要である。私たち以外の研究から、Tgf- β ・シグナル経路がAPC/Cの上流で働き、snoNがAPC/Cの標的のひとつであることが示唆されている。また、Tgf- β ・シグナル経路とプロテアソームの活性化を介して、後発白内障が発症する可能性が示唆されている。

3. 今後の展開

ヒトでは、白内障の手術後に副作用として、水晶体嚢が混濁する“後発白内障（posterior capsule opacification）”が知られており、手術後の予後の問題になっています。ヒト水晶体の培養系では、後発白内障の発症にTgf- β とユビキチン-プロテアソーム系が関与することが報告されています（図3D）（Hosler et al., 2006 *INVO* 47, 2569-2575.）。今後、ユビキチン-プロテアソーム系の水晶体分化における役割をさらに解明することで、白内障の治療の改善にも貢献することが期待されます。

【発表論文 詳細】

1) 発表先および発表日：Development（デベロップメント）2010年137号

2) 論文タイトル：The ubiquitin proteasome system is required for cell proliferation of the lens epithelium and for differentiation of lens fiber cells in zebrafish（ユビキチン-プロテアソーム系はゼブラフィッシュにおける水晶体上皮細胞の増殖と水晶体繊維細胞への分化に必要である）

3) 著者：今井文康¹、吉澤あすか¹、藤森典子²、川上浩一³、政井一郎¹

（所属）¹独立行政法人沖縄科学技術研究基盤整備機構、²独立行政法人理化学研究所、³大学共同利用機関法人 国立遺伝学研究所

*本研究は、独立行政法人理化学研究所および大学共同利用機関法人 国立遺伝学研究所との共同研究です。