

博士論文

# 眼形成における Pax6 の機能解析

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科

バイオサイエンス専攻

バイオ科学技術研究領域

学籍番号: 515305

氏名: 田端 裕正

## 目次

### 序論

RPE と NR の特徴と機能	3
眼の形態形成	4
転写因子 Pax6 について	5
Pax family の成立と DNA 結合ドメイン内在性の核局在シグナル	7
本研究の具体的な目的	9

### 材料と方法

ニワトリ胚	10
遺伝子発現コンストラクトの作製	10
エレクトロポレーション法	11
胚の固定と凍結切片の作製	11
<i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法	12
組織学的免疫染色法(免疫染色)	13

### 結果

改変型 Pax6 が及ぼす形態形成と分化マーカー発現への影響	14
改変型 Pax6 の細胞内での局在	17
Pax6 の核移行シグナル領域の探索	18

### 議論

### 今後の展望

### 謝辞

### References

### 図とその説明

## ・序論

生物の視覚機能は数多くの生物種間で保存されている。しかし、その機能を司る光感覚器官の形態は、われわれ脊椎動物が持つカメラ眼、昆虫類の持つ複眼、クラゲなどが持つ眼点、さらにはわずか3個の細胞からなるナメクジウオの眼（dorsal ocellus）など多種多様である。このように「眼」という器官は生物種間で多様性を示すが、それらには2つの共通点がある。一方は、光を感受する細胞である光受容細胞をもつということである。そして、他方は色素細胞をもつことである(Gehring and Ikeo, 1999; Carthew, 2007; Kozmik, 2008)。脊椎動物において、これら2種類の細胞種の視覚機能への関与については比較的よく解析されており、正常な視覚機能を維持するためには色素細胞と光受容細胞の両者が必須である。

本研究では、脊椎動物の眼を構成する2種類の組織である網膜色素上皮（RPE : retinal pigment epithelium）と神経網膜（NR : neural retina）の発生機構に焦点を当てた。RPE と NR は前述のそれぞれ色素細胞と光受容細胞に当たり、これらは眼胞と呼ばれる共通の組織を由来としている。発生が進行していく中で、共通の前駆細胞を持つ RPE と NR を分ける分子メカニズムを、転写因子 Pax6 の機能から探ることが本研究の目的である。そこで、背景説明として、まず RPE および NR の成体における機能の重要性を紹介する。

## ・ RPE と NR の特徴と機能

脊椎動物の眼の組織である RPE は、メラニン合成細胞が一層に並んだ上皮組織で(Bok, 1993; Steinberg, 1985)、NR のすぐ外側に接しながら、その全域を覆うような黒いシート状の細胞層として観察される。

RPE は、眼の外側に位置する血管と内側の NR とを隔てるバリアの一部を形成し(Marmorstein, 2001; Rizzolo, 1997; Bok, 1993; Steinberg, 1985)、レンズを通して強められた光エネルギーを RPE のメラニンによって吸収している(Bok, 1993; Boulton and Dayhaw-Barker, 2001)。また、イオンや水、代謝最終産物を NR 側から血液中へと輸送する際や (Hamann, 2002; Marmor, 1999; Dornonville de la Cour, 1993; Miller and Edelman, 1990; Steinberg, 1985)、

グルコースやレチノール、脂肪酸といった栄養物を血液から取り入れて光受容細胞に供給する際にその仲立ちをしている(Ban and Rizzolo, 2000; Bergersen *et al.*, 1999; Sugasawa *et al.*, 1994; Bazan *et al.*, 1992)。さらに、光受容細胞の外節を食食、消化することで、視覚機能に必要な物質が RPE に回収、リサイクルされて光受容細胞へと戻される(Finnemann, 2003; Gal *et al.*, 2000; Strauss *et al.*, 1998; Bok, 1993)。このように、RPE は単層の組織でありながら、また単層であるゆえに、成体の眼で多様な機能を有しており、正常な視覚機能の維持に必須の細胞群である。

NR も同様に脊椎動物の眼の組織の一部であるが、RPE と異なり、NR は、光受容細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞、ミュラー細胞といった神経細胞から構成される多層構造の組織である。RPE に接する面には光受容細胞が並び、成体の眼では光受容細胞と RPE (色素細胞) が密着している。また、レンズに面した側には神経節細胞が配置されており、この細胞によって視神経の束が構成されて外界の光情報を脳に投射している。

#### ・眼の形態形成

視覚機能に不可欠な組織である RPE と NR は眼胞 (OV : optic vesicle) と呼ばれる共通の組織を起源としている。OV が眼杯 (OC : optic cup) という構造に形態変化する過程で、RPE と NR のそれぞれに領域化される。この領域化が正常に行われない場合、本来 RPE になるべき領域に NR が形成される (あるいは本来 NR となる領域が RPE の特徴を持つ) といった分化転換が起こり、正常な視覚の獲得が困難になる。

まず、ニワトリ胚における RPE と NR 形成に至るまでの眼の形態形成について説明する。発生段階は Hamburger and Hamilton のニワトリ胚の発生段階表(Hamburger and Hamilton, 1992)をもとに示す。

外胚葉由来の頭部神経板は、発生が進むにつれて左右の端が隆起し、その後その両端がつながって袋状の構造を形成する。神経管の前部は脳胞と呼ばれ、その中でも間脳を形成する部分の一部から OV が形成される。OV は、脳胞の側面が左右に徐々に膨らんで形成される袋状の構造で、この膨出は Stage 10

(孵卵開始 33-38 時間) から顕著にみられる (Figure 1A)。OV がさらに膨出する一方で、脳胞と OV の連絡部分がくびれていき、Stage 12 (孵卵開始 45-49 時間) では OV が脳胞からできたこぶのような形状をとる (Figure 1B)。

OV が体の内側から接している表皮外胚葉が、Stage 13 (孵卵開始 48-52 時間) では肥厚してレンズの原基(レンズプラコード)となる (Figure 1C の LE)。また、Stage 13 では OV の外側部 (正中線から遠い部分) が内側 (正中線側) に向かって陥入することで、OV の外側部と背側 - 内側部が接して 2 層構造をとる OC が形成される (Figure 1C)。

OV の背側の内側部を由来とする OC 外層は予定 RPE 領域に (Figure 1C と D、RPE)、陥入した眼胞の外側部を由来とする OC 内層は予定 NR 領域になる (Figure 1C と D、NR)。また OV と脳胞をつなぐくびれた部分は眼柄を形成し、将来この部分を視神経束が通過する (Figure 1C と D)。

この後の Stage 17 (孵卵開始 52-64 時間) では、OC は三次元的に構造変化し、OC の 2 層構造が球体を描くようなかたちで腹側へと回り込んで、立体的な杯のような形をとる。また、このような形態形成の間に、レンズプラコードは正中線側に向かって陥入し、レンズ胞を形成するようになる (Figure 1D)。

以上のような形態形成の過程で大体の眼の構造が出来上がる。そして、発生の進行に従って毛様体や虹彩などの様々な眼の組織が形成され、成体の眼に近づいていく。

#### ・転写因子 Pax6 について

Pax6 は、機能面の特徴から「眼のマスター制御遺伝子」と呼ばれている。それは、Pax6 をコードする遺伝子を強制発現させると、ショウジョウバエの足や触覚、あるいは、アフリカツメガエル胚の頭部等に異所的な眼が形成されるため、強力な眼の形成誘導能をこの転写因子がもっていると考えられているためである (Gehring and Irako, 1999)。脊椎動物の正常発生過程では、発生中の眼のほとんどの組織で Pax6 の発現が見られ (Fig.2)、Pax6 の突然変異によっ

て、NR、RPE、レンズ、虹彩等を含む眼の組織に異常が生じる(Walther and Gruss, 1991 ; Kawakami *et al.* 1997,,review)。

加えて、Pax6(ProteinID: XP\_015141623.1)は Paired domain (PD、4 - 131 a.a. (コードされる Pax6 タンパク質の最初の (N 末端の) Met を 1 とした場合、4 番目から 131 番目までのアミノ酸配列。以下同様(Figure 3A 赤い領域)の領域)と Homeodomain (HD、209 - 270 a.a.(Figure 3A 緑の領域))と呼ばれる 2 つの DNA-binding domain をコードしている(Kozmik, 2005)。これらの DNA-binding domain はそれぞれが特異的な塩基配列を認識して結合することが知られている(Chi and Epstein ,2002 )。さらに、PD はその内部で個別に DNA への結合能を持つ N 末端側の PAI(PAIred)サブドメインと C 末端側の RED(paiRED)サブドメインの 2 つのサブドメインに別れていることが知られる(Xu *et al.*, 1999)(Fig3A)、それぞれの結合ドメインが異なる認識配列へと結合を果たす(Epstein *et al.*, 1994; Kozmik *et al.*, 2005)。つまり、Pax6 は 3 つのシスエレメントを認識して DNA に結合するとされているが、PAI と HD が協調して新たなシスエレメントに結合することも知られているため、4 つのシスエレメントに関わる下流因子調節機構を持っていることになる(Ninkovic *et al.*, 2010; Shaham *et al.*,2012)(Figure 3B)。

DNA-binding domain は多くがそれ自体の領域内に核移行シグナル(Nuclear localization signal : NLS)をもつことが知られている (Cokol *et al.*, 2000)。HD に関しては前述したように、内在性の NLS の所在と結合する輸送タンパク質が明らかにされており、HNLS<sup>5</sup> -LKRKLQR- (206 - 212 a.a.(Figure 3A 参照))と呼ばれる NLS が提示されて、核内輸送タンパク質である Importin13 (IPO13)が HD の 208 - 214 a.a.と 261 - 267 a.a.との両アミノ酸配列に結合することで核内への輸送が行われることが報告されている(Ploski *et al.*, 2004)。一方で、PD に関しては、Quail Pax6 について、exon5 にコードされるアミノ酸配列(chicken やヒト、マウスでは exon6 にコードされる Pax6 の 48-119 a.a. をコードに相当)を欠いた際に著しく核への局在性が低

下することしか知られていない(Carrière et al.,1995)。

現時点において、Pax6 は眼胞を共通の原基とする RPE と神経網膜の領域化や細胞増殖の促進(Klimova and Kozmik , 2014)、領域化後期に生じる毛様体や光受容細胞である視細胞の細胞種分化など多岐にわたる現象に強い関与が報告されている。私は、このほぼ同時期に機能する発生機構に、Pax6 がコードする 3 つのアイソフォーム（主にマウスで知られている）が深く関与しているのではないかと考えた。すなわち、PD と HD をどちらも持つ Pax6can、PD 内にある 2 つのサブドメイン(PAI サブドメインと RED サブドメイン)の内、PAI サブドメインに exon5a にコードされたアミノ酸配列が挿入されて PAI の DNA 結合能が失われ、RED サブドメインが DNA に結合するようになった Pax6(5a) (Shukla and Mishra., 2012)、そして PD そのものを持たない Pax6 $\Delta$ PD である (Shaham et al., 2012)。Pax6 がこれらのアイソフォームが時空間特異的に発現することで、隣接する組織の両方の分化を制御している可能性である。この点についてはこれまでまったく報告がなく、眼以外の他の組織で Pax6 の各アイソフォームが独自の働きを持っていることが報告されているのみである (Lens については Reza et al., 2002; Kim and Lauderdale,2008; Brain については Haubst et al., 2004)。

#### ・ Pax family の成立と DNA 結合ドメイン内在性の核局在シグナル

現在、脊椎動物では *Pax1*~*10* の Pax family に属する 10 個の遺伝子が確認されている。Pax6 の $\Delta$ PD isoform が独立したと考えられる *Pax10*を除いて、それらすべての遺伝子が PD をコードしており(Feiner et al., 2014)、PD が Pax family の下流因子調節機構に強く寄与していることは疑う余地も無い。PD は、DNA に結合するそれぞれが 3 つの $\alpha$ -helix からなる 2 つのサブドメインを持ち、各サブドメインが単独で DNA へ結合する(Epstein et al.,1994; Xu et al.,1999)。PD を形成するアミノ酸残基数には 2 つ説あるが本稿では 128 残基とさせていただく(128 残基(Xu et al.,1995)、133 残基(Xu et al., 1999)とも呼ばれる)。N 末端側に位置する 60 残基を PAI subdomain、2 つのサブドメインの間に存在

する 16 残基からなる非機能領域とされる linker、そして正確な残基数が明らかになっていないが、52~60 残基からなる C 末端側の RED subdomain である。これらの領域からなる PD は Tc1/mariner transposon を起源とし、もともと paired-type homeodomain を持っていた *Hox* 遺伝子へ Tc1/mariner transposon が挿入され、それ以降に何らかの形で PD 領域のみが残り、現存する Pax family の起源である *ancestor Pax* が形成されたこと。それによって今日の Pax family が構成されたと推論されている(Paixão-Côrtes *et al.*,2015)。多くの DNA binding domain には 2 つの特徴が存在する。1 つは当然ながら DNA 結合モチーフを持つこと、そしてもう 1 つは核局在シグナル(Nuclear localization signal : NLS)を DNA 結合モチーフとオーバーラップして存在しているということである(Cokol *et al.*, 2000)。Tc1/mariner に由来する PD であってもその例外ではなく、ヒトの Pax8 の PD やウズラ Pax6 の PD 領域をコードする Exon5(マウスやヒト、当研究で用いたニワトリなどでは Exon6 に相当する(Figure 4A))に NLS が存在することが知られている(Poleev *et al.*,1997; Carrière *et al.* 1995)。一方、Tc1/mariner transposon は PD 相同領域に NLS-like motif として basic leucine-zipper 構造を持つが、この basic leucine-zipper は多くの生物種の Pax family で欠失している (Ivics *et al.*, 1996)。したがって、PD 内在性の NLS は Pax family 成立後に 獲得された可能性がある。興味深いことに、Pax family のいくつかでは HD も NLS を持っていることが知られていて、HD 近傍にも NLS が存在することが明らかになっている(Poleev *et al.*,1997; Kovac *et al.*, 2000; Ploski *et al.*, 2004)。これらの報告は、Pax family が核内で DNA に結合する段階だけでなく、細胞質から核内輸送への段階でも Pax family にはこれらタンパク質に特有の制御が存在する可能性を示唆している。



- ・ 本研究の具体的な目的

転写因子 **Pax6** は、胚発生中、眼のほとんどの領域に発現している。その発現様式は、眼胞から眼杯に形態形成が進むにつれ、眼の領域化が起こり、NR と RPE への分化が進行していく中でも変わらず、ほとんどの領域で発現し続ける (Fig. 2)。これは一見、眼のマスター制御遺伝子 **Pax6** が領域化の際、RPE、NR の分化に関与せず別の働きを持っているようにも見える。しかしながら前述したように、**Pax6** は強い眼の形成誘導能をもっているため、眼の形態形成に必須の領域化ステップであるこの発生段階で、**Pax6** が RPE と NR 両方の分化誘導を行うことができるとも考えられる。

本研究では、眼の発生における領域化について、**Pax6** の機能を、*in vivo* で明らかにしようとした。内在的な **Pax6** よりもより強い誘導能を持たせるために機能亢進させた **Pax6** の各アイソフォームや、DNA 結合ドメインを改変した **Pax6** を発現させるコンストラクトを、眼の形態形成初期の眼胞に導入することで、以降のこの領域における、眼の発生に関わる遺伝子の発現への影響を *in ovo* で解析を行った。

## 材料と方法

・実験に用いたニワトリ胚は、三重県産水沢内部川農場産のニワトリ (*Gallus gallus*, White Leghorn) 受精卵を 38 °C で孵卵して得られた胚であり、各実験に適切な発生段階になるよう孵卵時間を調節した。本研究でのニワトリ胚の発生段階は、Humburger and Hamilton(1992)の発生段階表をもとに記す。

Humburger and Hamilton(1992)の発生段階表と比較して、胚の発生段階を判断し、stage 9 ~ 12 の胚の左側の眼に、当研究室で作成した改変型 *Pax6* 発現ベクターをエレクトロポレーション法を用いて導入した。

### ・遺伝子発現コンストラクトの作製

*Pax6* の解析に関連するベクターについては次の通りである。  
*pMiwIII-Pax6-VP16* は、野生型のニワトリ *Pax6* のコード領域の転写活性化ドメインをコードする部分 (339 番目から C 末端までのアミノ酸に相当) を除いた塩基配列を *pMiwIII* ベクターに組み込み、さらに Human herpesvirus 1 の Virion Protein 16 の転写活性化ドメインをコードする塩基配列 (413 - 490 番目のアミノ酸に相当) をコード領域の 3'-末端に付加したものである。  
*pMiwIII-Pax6-ΔPD-VP16* と *pMiwIII-Pax6-ΔHD-VP16*、*pMiwIII-Pax6-ΔPD-ΔHD-VP16* は、それぞれ *pMiwIII-Pax6-VP16* の Paired domain (5 - 131 番目のアミノ酸に相当) または Homeodomain (213 - 269 番目のアミノ酸に相当) をコードする領域をインバース PCR 法を用いて欠失させたものである (Figure 4B)。用いたプライマーセットは Table 1 に示した。  
*pMiwIII-Pax6-ΔPD-nls-VP16* は、*pMiwIII-Pax6-ΔPD-VP16* の Paired domain をコードする領域が欠失した部分に、Paired domain をコードする領域の一部 (48 - 83 番目のアミノ酸に相当) を In-Fusion HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer(Clontech)を用いて挿入することで作製した。同様に、*Pax6+5a-VP16* も *pMiwIII-Pax6can-VP16* に exon5a を挿入する形で作成

した。nls 探索用ベクターは pMiwIII-*Pax6-APD-nls-VP16* に挿入された nls 領域をインバース PCR 法を用いて欠損させることにより作製した(Table 1)。

#### ・エレクトロポレーション法

エレクトロポレーション法を用いたニワトリ胚への遺伝子導入は、既に報告されている方法を一部改変して行った(Tsukiji *et al.*,2009)。各種の遺伝子発現コンストラクトを終濃度 2~3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  に、pCAGGS-EGFP を終濃度 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  になるよう混合した DNA 溶液を調製した。この溶液を、stage 9~12 の片側の眼胞の内部に注入した上で、陰極を眼胞内に、陽極を眼胞をはさんで体の外側に配置し、7 V, 30 ms の条件で連続して 2 回の通電を行った。(Figure 5)

#### ・胚の固定と凍結切片の作製

取り出した胚を 4% Formardehyde/PBT に 2 時間浸して固定した。その後、4℃で PBT (0.1% Tween 20/PBS)を用いて胚を洗浄し、PBT を交換して振とうすることを 3 回繰り返す、その後、30% スクロース/PBS:OCT compound (SAKURA)= 1 : 2 の溶液に胚を浸し 2 時間振とう、90% スクロース/PBS : OCT compound=1: 2 中で 1 晩振とう操作を続けて行った後、90% スクロース/PBS : OCT compound= 1 : 2 に包埋した。これを用いて厚さ 8  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製した。

・ *in situ* ハイブリダイゼーション法

*in situ* ハイブリダイゼーション法に用いたプローブは、以下のようにして作成した。

ベクター	遺伝子名	polymerase
pGEM-T-easy	<i>Dct</i>	T7
pGEM-T-easy (Promega)	<i>Bmp4</i>	T7

スライドガラス上の凍結切片を PBT で洗浄し、1 µg/ml Proteinase K/PBT で 37°C、8 分間処理後、PBT で洗浄して、室温で、4% formaldehyde/PBT にて 20 分間再固定を行った。その後、PBT で切片を洗浄し、*in situ* ハイブリダイゼーション用のプローブ溶液を添加し、70°C で 1 晩ハイブリダイゼーション反応を行った。そして、65°C で 50% formamide/5× SSC(pH 5)/1% SDS および、50% formamide/2× SSC を順に用いて遊離しているプローブを取り除き、TBST (0.15 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Tween) で洗浄し、室温で 0.5% blocking regant/TBST にて 60 分間ブロッキングを行った後、AP-anti DIG antibody (Roche) を含む抗体溶液を添加して 1 晩 4°C で抗体反応を行った。その後、2 mM Levamisole/TBST および ALP buffer (0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M Tris-HCl pH 9.5, 0.1% Tween 20, 2 mM Levamisole) で洗浄後、35 µg/ml NBT (nitro blue tetrazolium)/ 17.5 µg/ml BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoryl phosphate p-toluidine salt)/ ALP buffer 中で遮光して発色反応を行い、封入して観察した。

・組織学的免疫染色法(免疫染色)

凍結切片を TBST で洗浄し、0.5% スキムミルク in TBST で 30 分間のブロッキングを行い、3% BSA in PBS で希釈した一次抗体溶液を切片に添加して 4℃にて一晩反応させた。一次抗体には、Mitf (1:1000, 当研究室で作製)、Otx2 (1:500, Abcam ab21990)に対するウサギポリクローナル抗体、Pax6 (1:500, DSHB)に対するマウスモノクローナル抗体、Trp2 (1:500, Santa Cruz sc-10451) ヤギポリクローナル抗体、Chx10 (1:500, Abcam ab16142)ヒツジポリクローナル抗体を、それぞれ括弧内に示した割合で希釈して用いた。その後、TBST で洗浄し、0.5% スキムミルク in TBST で 30 分間ブロッキング後、3% BSA in PBS で希釈した各々の二次抗体溶液を切片に添加して室温にて 2~3 時間反応させた。二次抗体には、一次抗体に対する Alexa 594 で標識した抗体を 500 倍に希釈して用いた。その後 DAPI を添加した TBST に浸し、TBST で洗浄後、封入して観察した。

## 結果

まずは、Figure 3B で示した、Pax6 の持つ 4 つの下流因子調節機構について行った解析結果を述べ、後に、Pax6 の持つ PD 内在性の NLS の解析について述べていく。

### ・ 改変型 Pax6 が及ぼす形態形成と分化マーカー発現への影響

Figure 3A に示すように、Pax6 タンパク質には Paired domain (PD) と Homeodomain (HD) の 2 種類の DNA 結合ドメインが内在している。加えて PD は 2 つのサブドメインを内包し(Fig.3A)、N 末端側の PAI サブドメイン、C 末端側の RED サブドメインそれぞれが異なるゲノム上のエレメントを認識する。加えて PAI サブドメインは Pax6 内在の HD と同時にエレメントに結合することで Pax6 は 1 つのタンパク質でありながら 4 つの異なる認識配列への結合が存在しているとされている(Figure 3B)。

このことから、我々は Pax6 による RPE と NR の分化という異なる細胞群への誘導は、Pax6 が結合する 4 種類のエレメントのうちいずれかを介することによって行われたのではないかと考えた。RPE 発生と NR 発生を Pax6 が促す可能性が考えられるため、それぞれの下流因子の発現調節領域に存在する標的のシスエレメントを介して調節機構を担うことになる機能亢進型の Pax6、あるいは改変型 Pax6 を用いて解析を行った。

孵卵器での加熱開始から 1.5 日目の HH9-11 の発生段階 に相当するニワトリ胚の眼胞に、*in ovo* エレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入を行い、その胚をさらに 2 日間孵卵した後 (HH20-22 の時期に相当) 固定し、観察に用いた。*Pax6can-VP16* の強制発現のために pMiwIII-*Pax6can-VP16* ベクターを、そのコントロールには pMiwIII の空ベクターを遺伝子導入した。いずれの場合にも *GFP* 発現ベクターを同時に導入して、遺伝子導入された領域が緑色蛍光で可視化できるようにした。この方法をとると、緑色蛍光を発する細胞には、

もう一方のベクターも導入されているはずである。

これ以降に示す、他の種類の発現ベクターについても、同様の方法で遺伝子導入実験を行い、強制発現される Pax6 タンパク質の機能を、当該領域の分化マーカー遺伝子の発現に着目して解析した。

pMiwIII の空ベクターを導入したコントロール眼の眼杯 では、RPE マーカーである *Mitf*、*Dct*、*Otx2*、*Trp2* (Figure 6B-F) の発現は OC 外層/予定 RPE 領域に見られ (Figure 6 B-F、RPE)、OC 内層/予定 NR 領域には発現が見られなかった。対照的に、*Chx10* は OC 内層/予定 NR 領域に発現し (Figure 6 G,H)、OC 外層/予定 RPE 領域では発現が見られなかった。以上のコントロール眼での各因子の発現パターンと組織の形態について、正常発生中の眼と顕著に異なる点はなかった。

改変型 Pax6、HD を欠きかつ核移行型のタンパク質をコードする Pax6-ΔHD-VP16 (PAI サブドメイン、あるいは PD 全域での DNA 結合能をもつ)、PD を欠きかつ核移行型のタンパク質をコードする Pax6-ΔPD-nls-VP16 (HD による DNA 結合能をもつ)と Pax6 isoform の機能亢進型である Pax6can-VP16 (PAI サブドメイン、あるいは PAI サブドメインと HD の協調)と Pax6(5a)-VP16 (RED サブドメイン、もしくは HD のみ)を用いて、眼の領域内において発現するであろう分化マーカーを用いてそれぞれの改変型 Pax6 の機能を解析した。

*Pax6can-VP16* の遺伝子導入によって、OC 外層/予定 RPE 領域では大きな遺伝子発現や表現型の変化は見られなかったが(Figure 7 A-F)、OC 内層/予定 NR 領域では本来生じえない NR の隆起が確認できた(Figure 7 A-F、矢印)。その隆起した細胞群の先端部分では *Chx10* の発現の減衰が確認できた(Figure 7 F)。

*Pax6+5a-VP16* 導入眼では、OC 外層/予定 RPE 領域、OC 内層/予定 NR 領域どちらでも形態的な変化は確認できなかったが、OC 内層/予定 NR 領域で

視細胞の 1 種である錐体細胞の分化マーカーである *Otx2* のシグナルと *Visinin* のシグナルが確認できた(Figure 7 J、N)が、RPE マーカーである *Mitf* の発現に変化は無く(Figure 7 H)、一部の胚で観察できた OC 内層/予定 NR 領域での細胞増殖部位で NR マーカーである *Chx10* の発現が損なわれた(Figure 7 K-L, 矢印)。

*Pax6-ΔHD-VP16* を発生中の眼に遺伝子導入した場合、OC 内層/予定 NR 領域に *Mitf* や *Otx2*、色素合成酵素である *Dct(Trp2)* の異所的な発現が観察された (Figure 8 A-F) ことに加えて、眼杯構造が形成されず、見た目上眼胞のまま眼領域すべてが RPE へと分化転換していることが確認できた (Figure 8 A-F)。

一方で、*Pax6-ΔPD-nls-VP16* が導入された眼では、*Pax6-ΔHD-VP16* で見られたような RPE 分化マーカーの発現は確認できなかった(Figure 8 G-M)。しかし、OC 内層/予定 NR 領域の背側が NR の多層構造が薄くなっているのが確認でき、同時に眼杯辺縁領域に発現が限局している *Bmp4* の発現領域がコントロールと比較して拡張していた(Figure 9 A-D)。

これらの結果から、機能亢進型 *Pax6* である *Pax6can-VP16* は NR 領域での神経細胞の細胞増殖と部分的な色素細胞分化を誘導し、*Pax6+5a-VP16* は視細胞の 1 種である錐体細胞への分化を促進した。改変型 *Pax6* である *Pax6ΔHD-VP16* は非常に強力に OC 内層/予定 NR 領域の RPE への分化転換を引き起こし、*Pax6-ΔPD-nls-VP16* は OC 内層/予定 NR 領域の背側領域での組織の薄層化を誘導することが確認できた。



・改変型 Pax6 の細胞内での局在

本実験で作製した各改変型 Pax6（模式図：Figure 10 A）、すなわち Pax6-ΔHD-VP16（Figure 10 B,E、左）、Pax6-ΔPD-VP16（Figure 10 C,F、中央）、Pax6-ΔPD-nls-VP16（Figure 10 D,G、右）が核へ局在することができるのか調べた。

生体内でタンパク質の細胞内局在を確認しているため、内因的な発現の影響を除外するために *Pax6-ΔHD-VP16* を、内因的な Pax6 タンパク質の発現が見られない組織（中脳）に導入し、Pax6 タンパク質の局在を解析した（Figure 10 B,E）。赤色で示される Pax6 のシグナルはそのほとんどが丸い形で、DAPI の青色の染色で示される核の丸い形のシグナルと重なった（Figure 10 E）。*Pax6-ΔHD-VP16* が導入された細胞の内、85.0%の細胞では Pax6 のシグナルが核でのみ観察され、残りの 15.0%では核と細胞質でもシグナルが観察された（Figure 10 H、*Pax6-ΔHD-VP16* のカラム）。細胞質のみに Pax6 シグナルが観察された細胞は見られなかった（Figure 10 H、*Pax6-ΔHD-VP16* のカラム）。

*Pax6-ΔHD-VP16* とは対照的に、*Pax6-ΔPD-VP16* がコードするタンパク質のシグナルが、多くの細胞で細胞質にて観察された（Figure 10 C と F）。また、*Pax6-ΔPD-VP16* が導入された細胞では、Pax6 のシグナルが *Pax6-ΔPD-VP16* 導入時のように丸い形を取っているものは少なかった（Figure 10F）。Pax6 のシグナルが DAPI の青色シグナルと重ならない細胞と（Figure 10F、矢頭）、一部 DAPI のシグナルが重なるものの DAPI のシグナルの見られない部分にも Pax6 のシグナルが見られる細胞があり（Figure 10 F、矢印）、前者を「Pax6 が細胞質にのみ局在している」、後者を「Pax6 が核と細胞質の両方に局在している」状態と判断した。*Pax6-ΔPD-VP16* が導入された細胞の内、Pax6 のシグナルが核でのみ観察されたものは 36.2%しかなく、Pax6 のシグナルが細胞質でのみ見られたものは 13.5%だった（Figure 10H、*Pax6-ΔPD-VP16* のカラム）。核と細胞質の両方に Pax6 のシグナルが見られた細胞は 50.3%だった（Figure 10 H、*Pax6-ΔPD-VP16* のカラム）。

核への局在性が著しく低下した *Pax6-ΔPD-VP16* へ、Carrière らの示す PD 内在性の NLS 領域を N 末端側と C 末端側の 2 つに分けてそれぞれ挿入し、高い核局在性を示した N 末端側の *Pax6-ΔPD-nls-VP16* がコードするタンパク質

の局在を解析した (Figure 10 D,G)。 *Pax6-ΔHD-VP16* が導入された細胞と同様に、赤色で示される Pax6 のシグナルはそのほとんどが丸い形で、DAPI の青色の染色で示される核の丸い形のシグナルと重なった細胞が多く見られた (Figure 10G)。 *Pax6-ΔPD-nls-VP16* の表に示すように、 *Pax6-ΔPD-nls-VP16* が導入された細胞の内、81.9%の細胞では Pax6 のシグナルが核でのみ観察され、残りの 18.1%の細胞では核と細胞質の両方にシグナルが観察された (Figure 10 H、 *Pax6-ΔPD-nls-VP16* のカラム)。細胞質のみに Pax6 シグナルが観察された *Pax6-ΔPD-nls-VP16* を細胞は見られなかった (Figure 10 H、 *Pax6-ΔPD-nls-VP16* のカラム)。以上に示した *Pax6-ΔPD-nls-VP16* のコードするタンパク質の細胞内での局在に関する比率は、 *Pax6-ΔHD-VP16* を導入した場合とほぼ同じ比率を示した (Figure 10 H、 *Pax6-ΔHD-VP16* と *Pax6-ΔPD-nls-VP16* の両カラムを比較)。

以上をまとめると、Pax6-VP16 において PD をコードする領域を欠損させた場合、著しい核移行レベルの低下が見られたが、nls をコードする領域を付加することで、核移行レベルの回復が見られた。

#### ・ Pax6 の核移行シグナル領域の探索

先述の *Pax6-ΔPD-nls-VP16* に付加した nls をコードする領域は、Carrière らの *in vitro* の実験による報告 (Carrière *et al.*, 1995) を参考にして得られた領域をさらに狭めたものである。この領域は PD をコードする領域の約 1/4、PD の 128 残基中 36 残基を占めている。さらに、既知の nls では 7-10 残基とされているが (たとえば、7 残基の NLS であれば p53 (-PQPKKKP-, (Liang and Clarke. 1999)、9 残基の NLS であれば c-myc (-PAAKRVKLD-, (Dang and Lee. 1988)))、それらと比較しても最大で約 4 倍の長さのアミノ酸配列をコードしている。したがって、HD の機能を解析するために、PD 活性をできる限り排除した *Pax6-ΔPD-nls-VP16* のコンストラクトを作製する必要があると考えた。そこで、*Pax6-ΔPD-nls-VP16* の nls 領域 (48-83 amino acids [a.a.]) をコードする領域を断片化したコンストラクトを作製し、遺伝子導入して発現したタンパク質の細胞内での局在を調べた。断片化した nls 領域は、N 末端側からそれぞれ

れ 48-53 a.a.、48-56 a.a.、52-61 a.a.、57-65 a.a.、61-70 a.a.、66-74 a.a.、70-79 a.a.、75-83 a.a.、78-83 a.a.とした。これは、両端をのぞいて 9-10 残基ずつ解析したことになる。なぜなら既知の NLS 活性を持つアミノ酸配列は 7-10 残基とされているため、PD 内在性の NLS の脱落を回避できると考えたためである。

48-53 番目のアミノ酸配列をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* を導入した場合 (Figure 11A と F)、*Pax6* のシグナルが核でのみ観察されたものは 47%で、*Pax6* のシグナルが細胞質でのみ見られたものは 8%だった (Figure 11K、48-53 a.a.のカラム)。核と細胞質の両方に *Pax6* のシグナルが見られた細胞は 45%だった (Figure 11K、48-53 a.a.のカラム)。

48-56 番目のアミノ酸配列をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* を導入した場合には (Figure 11B と G)、*Pax6* のシグナルが核でのみ観察されたものは 44%で、*Pax6* のシグナルが細胞質でのみ見られたものは 5%だった (Figure 11K、48-56 a.a.のカラム)。核と細胞質の両方に *Pax6* のシグナルが見られた細胞は 50%だった (Figure 11K、48-53 a.a.のカラム)。48-53 番目のアミノ酸配列をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* を導入した場合と比較して、ほぼ変わらない核移行レベルを示した。

52-61 番目のアミノ酸配列をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* を導入すると (Figure 11C と H)、*Pax6* のシグナルが核でのみ観察されたものは 62%で、*Pax6* のシグナルが細胞質でのみ見られたものは 4%だった (Figure 11K、52-61 a.a.のカラム)。核と細胞質の両方に *Pax6* のシグナルが見られた細胞は 35%だった (Figure 11K、nls(52-61 a.a.のカラム)。

同様に、57-65 番目のアミノ酸配列をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* の導入では (Figure 11D と I)、*Pax6* のシグナルが核でのみ観察されたものは 86%で、*Pax6* のシグナルが細胞質でのみ見られたものは 2%だった (Figure 11K、57-65 a.a.のカラム)。核と細胞質の両方に *Pax6* のシグナルが見られた細胞は 12%だった (Figure 11K、57-65 a.a.のカラム)。48-56 番目のアミノ酸配列をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* の場合と比較すると、*Pax6* が核のみに局在している細胞が多く観察された (Figure 11H、48-56 a.a.と 57-65 a.a.の両カラムを比較)。

61-70 番目のアミノ酸配列をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* を導入

した場合 (Figure 11E と J)、Pax6 のシグナルが核でのみ観察されたものは 63% で、Pax6 のシグナルが細胞質でのみ見られたものは 3% だった (Figure 11K、61-70 a.a. のカラム)。また核と細胞質の両方に Pax6 のシグナルが見られた細胞は 34% だった (Figure 11K、61-70 a.a. のカラム)。

同じく、66-74 番目のアミノ酸配列をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* を導入した場合には (Figure 12A と F)、Pax6 のシグナルが核でのみ観察されたものは 77% で、Pax6 のシグナルが細胞質でのみ見られたものは 3% だった (Figure 13K、66-74 a.a. のカラム)。核と細胞質の両方に Pax6 のシグナルが見られた細胞は 20% だった (Figure 12K、66-74 a.a. のカラム)。

70-79 番目のアミノ酸配列をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* を導入すると (Figure 12B と G)、Pax6 のシグナルが核でのみ観察されたものは 59% で、Pax6 のシグナルが細胞質でのみ見られたものは 4% だった (Figure 12K、70-79 a.a. のカラム)。核と細胞質の両方に Pax6 のシグナルが見られた細胞は 37% だった (Figure 12K、70-79 a.a. のカラム)。70-79 番目のアミノ酸配列をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* を導入した場合でも高い核局在レベルを示すデータが得られた。

75-83 番目のアミノ酸配列をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* の導入では (Figure 12C と H)、Pax6 のシグナルが核でのみ観察されたものは 51% で、そのシグナルが細胞質でのみ見られたものは 4% だった (Figure 12K、75-83 a.a. のカラム)。核と細胞質の両方に Pax6 のシグナルが見られた細胞は 45% だった (Figure 12K、75-83 a.a. のカラム)。

78-83 番目のアミノ酸配列をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* を導入した場合 (Figure 12D と I)、Pax6 のシグナルが核でのみ観察されたものは 54% で、細胞質でのみ見られたものは 4% だった (Figure 12K、78-83 a.a. のカラム)。核と細胞質の両方に Pax6 のシグナルが見られた細胞は 43% だった (Figure 12K、78-83 a.a. のカラム)。75-83 番目のアミノ酸配列をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* を導入した場合と比較して、ほぼ変わらない核移行レベルを示した。

また、nls 領域 (48-83 a.a.) を含まない領域として 84-119 番目のアミノ酸をコードする領域を付加した改変型 *Pax6* を導入した結果、Pax6 のシグナルと

DAPI の青色のシグナルとの重複がほとんど見られなかった (Figure 12E と J)。57-65 番目および 66-74 番目のアミノ酸を付加した改変型 Pax6 と比較して、核のみに移行が見られた細胞数の割合が 23% となり、核移行レベルが著しく低下が見られた (Figure 12K の 84-119 a.a. のカラム)。

断片化した nls 領域に RPE 化を誘導するような PD 活性 (Figure 8 A-F) が含まれているか解析を行った。断片化した nls をコードする領域を付加した改変型 Pax6 のいくつかを発生中の眼に導入し、OC 内層/予定 NR 領域での RPE 分化マーカーである Mitf の異所的な発現誘導を調べた (data not shown)。しかし、PD 活性を持つコンストラクトである Pax6- $\Delta$ H<sub>2</sub>D-VP16 で見られたような OC 内層/予定 NR 領域での Mitf の異所的な発現誘導は見られなかった。

## 議論

本研究では、眼の形態形成において重要な発生ステップである RPE と NR の領域化において、Pax6 がどのような機能を担っているかを解析したものである。

### ・ Pax6 can isoform による RPE 分化誘導と細胞増殖

眼の発生、特に脳胞に由来する組織において、Pax6 は Figure 4B で示した 4 つのシスエレメントへの結合様式をもつとされている。それらを本解析の結果に照らし合わせると、①PAI サブドメインと HD を用いたと考えられる場合は(神経)細胞の増殖(Figure 7 A-F)、②HD のみを用いた場合は(神経、あるいは色素細胞への分化途中の)細胞増殖の抑制(Figure 9 C,D)、③PD、あるいは PAI サブドメインを用いた場合、色素合成酵素の発現を伴う色素細胞への分化誘導(Figure 8 A-F)、④RED サブドメインのみを用いたと考えられる場合は視細胞分化(Figure 7 I-J, M-N)といった、眼の発生過程において、まったく異なる機能をもつ可能性を示した。

はじめに、Pax6can では、OC 内層/予定 NR 領域での細胞増殖が部分的に確認でき、さらに Chx10 の減衰が確認できた。発生初期の NR で、Pax6 の発現を時期特異的にノックアウトすると細胞増殖性が低下する(Klimova and Kozmik, 2014)。このことから、Pax6 は(神経)細胞増殖を促す機能を持つことが考えられる。本解析によって、Pax6can isoform が(神経)細胞増殖を担う可能性が考えられるが、Pax6can のシスエレメントへの結合モチーフにおいて、争点となるのは PAI と HD を用いて行った可能性のある(神経)細胞増殖と PD、あるいは PAI サブドメインのみを用いた色素細胞分化の切り替えがどのようにして行われているかである。

Pax6 は Wnt signaling を介して、表皮外胚葉から RPE の分化を誘導し、より直接的に、Mitf と関与することによって促していることが知られている(Häggglund et al., 2013, Bharti et al., 2012, Raviv et al., 2014, Carpenter et al., 2015)。つまり、表皮外胚葉由来の Wnt signal 経路によって誘導される  $\beta$ -catenin(Steinfeld et al., 2013, Fujimura et al., 2015)、あるいは、 $\beta$ -catenin によって発現が誘導される転写因子 Otx2 や Mitf (Westenskow et al., 2009)との相互作用によって Pax6can の DNA への結合様式が変化する可能性が示唆で

きる。

PAI サブドメインのみがシスエレメントに結合する、PD のみの Pax6 導入眼では、予定 NR 領域に RPE 分化マーカーである *Mitf*, *Otx2* の発現が異所的に確認できた。加えて、pigmentation gene である *Dct* の発現が確認できた。OC 内層/予定 NR 領域が RPE 様に単層化を起こし、NR 特有の多層構造を維持できなくなっている。正常な発生であれば眼胞から眼杯へ発生が進行するが、PD のみを持つ Pax6 導入眼では眼胞状の構造を維持したまま発生が進行している。これらの結果から、Pax6 の PD(PAI サブドメインを用いた下流因子調節機構)は、眼胞から眼杯への発生過程において、RPE への分化誘導を強く行っていることを示唆している。また、Pax6 $\Delta$ PD によって、眼杯形成期において RPE 領域で細胞増殖を抑えることによって、NR を裏打ちするような RPE 特有の単層の組織構造を構成している可能性が考えられる。

#### ・ HD による毛様体分化誘導

Pax6 のもう 1 つの DNA 結合ドメインである HD のみを持つ Pax6(Pax6 $\Delta$ PD-nls-VP16)では、RPE 分化マーカーの発現に変化は見られなかった。同様に、予定 NR 領域における NR 分化マーカーの発現にも影響を与えることはなかった。だが、正常発生において、眼杯辺縁領域に発現が確認できる因子である *Bmp4* の内層への発現領域の拡張が確認できた。

Pax6 $\Delta$ PD isoform の発現部位は、眼杯辺縁領域に限局していることが知られており(Kim and Lauderdale, 2008)、この眼杯辺縁部の細胞種は初期眼形成期において、表皮外胚葉からの Wnt signaling を受け、予定 RPE 領域を伸展させることで眼胞から眼杯への移行期における杯状構造の形成に機能していると考えられている(Carpenter et al., 2015)。加えて、*Bmp4* は毛様体(ひいては将来の虹彩)形成にも発現しており、何らかの関与が示唆されている(Napier and Kidson, 2007)。さらに *Bmp4* の発現量の増加は上皮間葉転換を抑える機能を持ち(Yao et al., 2016)、眼杯辺縁領域における *Bmp4* の発現量の増加は、神経細胞で構成されている NR の上皮細胞である RPE への細胞種の転換が行われる際に、上皮間葉転換が起こらないように抑制している可能性も考えられる。

- ・ Pax6(5a)による視細胞分化誘導

前述のように、Pax6 は眼の発生において、異なる組織の特異化を行っている。

しかし、*Pax6+5a isoform* 導入眼では他の改変型 Pax6 を導入した時ような、OC 内層/予定 NR 領域で RPE-like な組織への分化転換、細胞増殖の促進や細胞増殖の抑制といった形態的な変化は見られなかった。だが、遺伝子の発現レベルで確認すると、本来この時期には NR で発現していない Otx2 や Visinin といった視細胞の一種である錐体細胞マーカーの発現が確認できた。これは、Pax6(5a)によって視細胞分化が誘導されたことを示している。視細胞の分化の際、Pax6 の発現が失われると、6 種の視細胞のうち 1 種の細胞しかできなくなる(Marquardt *et al.*, 2001)。このことを加味すると、本解析で観察された視細胞の分化誘導から、Pax6(5a)は少なくとも錐体細胞の誘導に強く関与していることが示唆できた。興味深いところは、Pax6 の PD を含む isoform である Pax6can と Pax6(5a)はお互いの発現を抑制しあうということである(Yamaguchi *et al.*, 1997)。今回、NR で確認できた一部細胞での視細胞への早期分化はこの抑制機構が働き、Pax6(5a)が *Pax6can isoform* の発現を抑制したことによって、生じた現象なのではないだろうか。

眼の発生中に Pax6 は様々な組織の形成や細胞分化に強く働きかけていることが知られている。しかし実際は、様々な調節によって今現在、広く知られている Pax6 の働きが行われているということである。

たとえば、それは本研究で解析したような機能的に異なる Pax6 の isoform や異なるシスエレメントへの結合様式といった Pax6 自体の調節機構。あるいは特異化した細胞内で発現している遺伝子群との相互作用や先に述べた、Pax6 の自律抑制的な調節機構の様な、組織・細胞といった周辺環境まで巻き込んだ調節機構によって生じているとすれば、急速に進行する個体発生中の Pax6 の機能解析を経時的に行うことのむずかしさの理由であるのかもしれない。



#### ・ NLS の探索とその起源

前述したように、PD の起源である Tc1/mariner が PD 相同領域に持つ NLS-like motif とされている basic leucine-zipper 構造は、多くの生物種の Pax family で欠失している (Ivics et al., 1996) 。したがって、Pax family の PD 内に存在する NLS は、Pax family の成立以後に獲得した NLS である可能性がある。通常、NLS とされている領域には、正の電荷を持つアミノ酸であるリジンやアルギニン(ヒスチジンを含む場合もあるが解析領域に存在しない)が複数存在し、リジン、アルギニンリッチな領域であるとされているが(Liang and Clarke. 1999

Dang and Lee. 1988)、本解析で作製した細分化した PD-NLS 群には 1 つか 2 つのリジンあるいはアルギニンを含むものばかりで、これらアミノ酸残基のリッチ領域であるとは考えにくい。

PD は 2 つのサブドメインを持ち、それぞれが 3 つの $\alpha$ ヘリックスを持ち、両者はそれぞれ異なる DNA 配列へと結合する。PD の N 末端側の PAI サブドメインと C 末端側の RED サブドメイン、そしてそれら 2 つのサブドメインをつなぐ非機能領域とされている linker 部分から構成されている(Epstein et al.,1994 ;Xu et al.,1999)。本解析で明らかになった NLS 領域は、PAI サブドメインの最も C 末端側の $\alpha$ ヘリックスである $\alpha$ 3 全域を含み、linker 部分、そして RED サブドメインの N 末端側の $\alpha$ 4 の前半までの広範囲にわたる。中でも特に高い NLS 活性を持つ I57-S65 は $\alpha$ 3 の C 末端に位置し、次いで NLS 活性の高かった I66-S74 は linker 部分に相当している(Figure13)。

Pax6 の変異は眼の中でも虹彩に最も顕著に異常が生じる。それは重篤なものであれば虹彩が形成されない無虹彩症を引き起こし、視力に多大な影響を与える。Pax6 内在性の NLS、特に PD-NLS をコードする部分での missence 変異は同様に虹彩の異常構造を引き起こすが、興味深い事に、むしろそれ以外の白内障や眼振、網膜色素の減少といった、無虹彩症の合併症状として知られる眼疾病を生じているのである(Tzoulaki et al., 2005; Hingorani et al., 2009 )。それも、PD-NLS 内のすべての missence 変異でそれらの症状が一樣に現れているわけではない。つまりは、これらの Pax6 の変異によって引き起こされる眼発生異常に由来する疾病の多様性が、短いアミノ酸配列それぞれで NLS 活

性を持つ PD-NLS に由来するものだとすれば、様々な眼疾病が発症する際、PD-NLS 中で主として持ちいられる短い NLS の作用する時期や組織で異なっているために眼疾患に多様性があらわれている可能性がある。たとえば、本解析で最も高い NLS 活性を示した I56-S65 の部分は PAI サブドメインの  $\alpha 3$  ヘリックスに位置しているが、Pax6 の 1 アイソフォームである Pax6(5a)では PAI サブドメインへの exon 5a にコードされる配列の挿入によって構造変化が起こり、PAI サブドメインが DNA 結合能を失うと同時に、I56-S65 が核移行の際に提示できるようになる可能性もある。また、ニワトリでは PAI subdomain と HD をコードするが、RED subdomain を持たない Pax6 isoform が存在する。この isoform には本解析で明らかになった PD-NLS すべてコードしないものと V48-V53 をコードするものが存在し、前者がマウスやヒトで見られる HD のみをコードする Pax6 $\Delta$ PD の役割を、後者が PAI-HD の下流因子調節を行っている可能性が考えられるので、核移行の際に用いられる NLS と Pax6 の下流因子調節機構には何らかの相関性が存在する可能性がある。

## 今後の展望

本解析の結果、Figure3B で示した Pax6 の 4 つの下流因子調節機構は明らかに異なる組織の特性を生じることが明らかになった。しかし、これらの現象の中でも、(神経)細胞の増殖を促したり、あるいは抑制したりする働きに関してはあまり報告が無い。また、種々の組織への影響は生体、特に人体においては虹彩の形成不全である無虹彩症に帰結する。いくつかの報告として朝顔症候群や黄斑部の中心窩形成不全、先天性白内障などを示すが、それらも無虹彩症に付随する形で発症している。ヒトでは相同染色体での欠損が生じるとは考えにくく、また、完全な Pax6 の欠損はマウスにおいて眼形成不全、あるいは頭部欠損を生じるため、Pax6 を原因とするヒト疾患は対立遺伝子の機能不全であると考えられる。

そして、マウスで知られる Pax6 の 3 つの isoform のうち、Pax6can と Pax6(5a)は互いに異なる isoform の発現を抑制するために、自身の isoform の発現量を増加させている。これによってどちらかの染色体での機能不全が生じたとしても、(母系優性のような状態で無い限りは)この対立遺伝子に変異が生じた場合でも 2 つの Pax6 isoform の機能が損なわれることは考えにくい。よって、ヒトの Pax6 を原因とした疾患、特に対立遺伝子機能不全による Pax6 の量的な減少の影響を強く受ける可能性が存在するのは Pax6 $\Delta$ PD であり、それを裏付けるかのように発生過程の虹彩や毛様体付近で発現が確認されている (Kim and Lauderdale,2008)。そのため、毛様体や虹彩の形成には Pax6 $\Delta$ PD が強く関与している可能性がある。

本解析では、他のタンパク質との結合する転写活性化領域についての言及は一切行っていない。その半ばから VP16 に変更したと言うのもあるが、Pax6 の PST は生物種間でいくつかの多様性が見られるからである。最もよく解析されているマウスとヒト間では、ヒトを含む旧世界ザル、狭鼻猿類の多くは 345 残基以降にマウスでは見られないアミノ酸配列を含んでいる。これらの多様性

は種の特異性として存在する可能性が高い。事実、ニワトリを含む鳥類のみ、PST 領域のアミノ酸残基 306-311 の有無が存在する可能性が示唆されている。また、本解析では PST で他のタンパク質との相互作用を解析することは念頭においてはしない。なぜなら、*in vivo* の解析において他のタンパク質との複合体形成に関する解析を行うことは困難であるためである。

本解析のような *in vivo* での解析では、どのような細胞種で Pax6 isoform を選択的に発現するか、の制御機構や特異化した細胞内で発現する遺伝子群との相互作用といった緻密な解析を行うことは難しいため、Pax6 と細胞種特異的に発現する転写因子との相互作用を確認するために免疫沈降や two-hybrid assay といった解析を行うことで、視細胞や毛様体、虹彩といった組織の形成機構の解析の一助になるだけでなく、再生医療分野で iPS 細胞から RPE 細胞を作製する際に Pax6 が使用されているが、Pax6 の更なる解析が進めば、虹彩や毛様体、さらに、眼球の作製も視野に入るかもしれない。

## 謝辞

ご指導いただいた山本博章先生と研究室のすべての方に多大なる感謝を示し、謝辞とさせていただきます。

## References

- Ban Y. and Rizzolo L.J. (2000) Differential regulation of tight junction permeability during development of the retinal pigment epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C744-C750.
- Bazan N.G., Gordon W.C., Rodriguez de turco E.B. (1992). Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. *Adv Exp Med Biol* 318:295-306.
- Bergarsen L., Johannson, E., Veruki M.L., Nagelhus E.A., Halestrap A., Sejersted O.M., Ottersen O.P. (1999) Cellular and subcellular expression of monocarboxylate transporters in the pigment epithelium and retina of the rat. *Neuroscience* 90: 319-331.
- Bharti K., Gasper M., Ou J., Brucato M., Clore-Gronenborn K., Pickel J., and Arnheiter H. (2012) A regulatory loop involving PAX6, MITF, and WNT signaling controls retinal pigment epithelium development. *PLoS Genet.* 8, e1002757.
- Bok D. (1993) The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl* 17:189-195.
- Boulton M. and Dayhaw-Barker P. (2001) The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond)* 15:384-389.
- Carpenter A.C., Smith A.N., Wagner H., Cohen-Tayar Y., Rao S., Wallace V., Ashery-Padan R., and Lang R.A. (2015) Wnt ligands from the embryonic surface ectoderm regulate 'bimetallic strip' optic cup morphogenesis in mouse. *Development.* 142, 972-82.
- Carriere C., Plaza S., Caboche J., Dozier C., Bailly M., Martin P. and Saule S. (1995) Nuclear localization signals, DNA binding, and transactivation properties of quail Pax-6 (Pax-QNR) isoforms. *Cell Growth Differ* 6:1531-1540.
- Carthew R.W. (2007) Pattern formation in the *Drosophila* eye. *Curr Opin*

- Genet Dev 17:309-313.
- Chi N.,and Epstein J.A. (2002) Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. Trends Genet. 18,41-7.
- Cokol M, Nair R, Rost B. (2000) Finding nuclear localization signals. EMBO Rep. 1, 411-5.
- Dang C.V.,and Lee W.M. (1988) Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. Mol Cell Biol. 8, 4048-54.
- Dornonville de la Cour M. (1993) Ion transport in the retinal pigment epithelium. A study with double barrelled ion-selective microelectrodes. Acta Ophthalmol Suppl. 209:1-32.
- Epstein J.A., Glaser T., Cai J., Jepeal L., Walton D.S.,and Maas R.L. (1994) Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. Genes Dev. 8, 2022-34.
- Feiner N, Meyer A, Kuraku S. (2014) Evolution of the vertebrate Pax4/6 class of genes with focus on its novel member, the Pax10 gene. Genome Biol Evol. 6(7):1635-51.
- Finnemann S.C. (2003) Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. EMBO J 22:4143-4154.
- Fujimura N., Klimova L., Antosova B., Smolikova J., Machon O. and Kozmik Z. (2015) Genetic interaction between Pax6 and  $\beta$ -catenin in the developing retinal pigment epithelium. Dev Genes Evol 225(2):121-128.
- Gal A., Li Y., Thompson D.A., Weir J., Orth U., Jacobson S.G., Apfelstedt-Sylla E. and Vollrath D. (2000) Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. Nat Genet 26:270-271.
- Gehring W.J. and Ikeo K. (1999) Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. Trends Genet 15:371-377.
- Hägglund A.C., Berghard A.,and Carlsson L. (2013) Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signalling is essential for optic cup formation. PLoS One. 8,

e81158

- Hamburger V. and Hamilton H.L. (1992) A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 195:231-272.
- Hamann S. (2002) Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int Rev Cytol* 215:395-431.
- Haubst N., Berger J., Radjendirane V., Graw J., Favor J., Saunders G.F., Stoykova A., and Götz M. (2004) Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development. *Development*. 131, 6131-40.
- Hingorani M, Williamson K.A., Moore A.T., van Heyningen V. (2009) Detailed Ophthalmologic Evaluation of 43 Individuals with PAX6 Mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50,2581-90
- Ivics Z, Izsvak Z, Minter A, Hackett PB. (1996) Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**, 5008-13.
- Kawakami A., Kimura-Kawakami M., Nomura T. and Fujisawa H. (1997) Distributions of PAX6 and PAX7 proteins suggest their involvement in both early and late phases of chick brain development. *Mech Dev* 66:119-130
- Kim J. and Lauderdale J.D. (2008) Overexpression of pairedless Pax6 in the retina disrupts corneal development and affects lens cell survival. *Dev Biol* 313:434-454
- Klimova L. and Kozmik Z. (2014) Stage-dependent requirement of neuroretinal Pax6 for lens and retina development. *Development*. 141,1292-302.
- Kovac CR, Emelyanov A, Singh M, Ashouian N, Birshstein BK. (2000) BSAP (Pax5)-importin alpha 1 (Rch1) interaction identifies a nuclear localization sequence. *J Biol Chem*. 275, 16752-7.
- Kozmik Z. (2005) Pax genes in eye development and evolution. *Curr Opin Genet Dev* 15:430-438.

- Kozmik Z., Ruzickova J., Jonasova K., Matsumoto Y., Vopalensky P., Kozmikova I., Strnad H., Kawamura S., Piatigorsky J., Paces V., and Vlcek C. (2008) Assembly of the cnidarian camera-type eye from vertebrate-like components. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 8989-93.
- Liang S.H., and Clarke M.F. (1999) The nuclear import of p53 is determined by the presence of a basic domain and its relative position to the nuclear localization signal. *Oncogene.* 18, 2163-6.
- Marmor M.F. (1999) Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. *Doc Ophthalmol* 97:239-249.
- Marmorstein A.D. (2001) The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic* 2:867-872.
- Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N, Scardigli R, Guillemot F, Gruss P. (2001) Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell.* 105, 43-55.
- Miller S.S. and Edelman J.L. (1990) Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium. *J Physiol* 424:283-300
- Muller F., Rohrer H. and Vogel-Hopker A. (2007) Bone morphogenetic proteins specify the retinal pigment epithelium in the chick embryo. *Development* 134:3483-3493
- Napier H.R. and Kidson S.H. (2007) Molecular events in early development of the ciliary body: a question of folding. *Exp Eye Res.* 84, 615-25.
- Ninkovic J, Pinto L, Petricca S, Lepier A, Sun J, Rieger MA, Schroeder T, Cvekl A, Favor J, Götz M.(2010) The transcription factor Pax6 regulates survival of dopaminergic olfactory bulb neurons via crystallin  $\alpha$ A. *Neuron.* 68,682-94.
- Oron-Karni V, Farhy C, Elgart M, Marquardt T, Remizova L, Yaron O, Xie Q, Cvekl A, Ashery-Padan R. (2008) Dual requirement for Pax6 in retinal progenitor cells. *Development.* 135, 4037-4047.
- Paixão-Côrtes, V.R., Salzano, F.M., and Bortolini, M.C. (2015) Origins and evolvability of the PAX family. *Semin. Cell Dev. Biol.* 44, 64-74.



- Ploski JE, Shamsheer MK, Radu A. (2004) Paired-type nucleus by karyopherin 13. *Mol Cell Biol.* 24, 4824-34.
- Poleev A, Okladnova O, Musti AM, Schneider S, Royer-Pokora B, Plachov D.(1997) Determination of functional domains of the human transcription factor PAX8 responsible for its nuclear localization and transactivating potential. *Eur J Biochem.* 247, 860-9.
- Raviv S., Bharti K., Rencus-Lazar S., Cohen-Tayar Y., Schyr R., Evantal N., Meshorer E., Zilberberg A., Idelson M., Reubinoff B., Grebe R., Rosin-Arbesfeld R., Lauderdale J., Luty G., Arnheiter H., Ashery-Padan R. (2014) PAX6 regulates melanogenesis in the retinal pigmented epithelium through feed-forward regulatory interactions with MITF. *PLoS Genet.* 10, e1004360.
- Reza HM, Ogino H, Yasuda K. (2002) L-Maf, a downstream target of Pax6, is essential for chick lens development. *Mech Dev.* 116, 61-73.
- Rizzolo L.J. (1997) Polarity and the development of the outer blood-retinal barrier. *Histol Histopathol* 12:1057-1067.
- Shaham O., Menuchin Y., Farhy C and Ashery-Padan R. (2012) Pax6: A multi-level regulator of ocular development. *Progress in Retinal and Eye Research* 31:351-376
- Shukla S. and Mishra R.(2012) Predictions on impact of missense mutations on structure function relationship of PAX6 and its alternatively spliced isoform PAX6(5a). *Interdiscip Sci.* 4,54-73.
- Steinberg R.H. (1985) Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol* 60:327-346.
- Steinfeld J., Steinfeld I., Coronato N., Hampel M.L., Layer P.G., Araki M.,and Vogel-Höpker A. (2013) RPE specification in the chick is mediated by surface ectoderm-derived BMP and Wnt signalling. *Development.* 140, 4959-69.
- Strauss O., Stumpff F., Mergler S., Wienrich M. and Wiederholt M. (1998) The Royal College of Surgeons rat: an animal model for inherited retinal

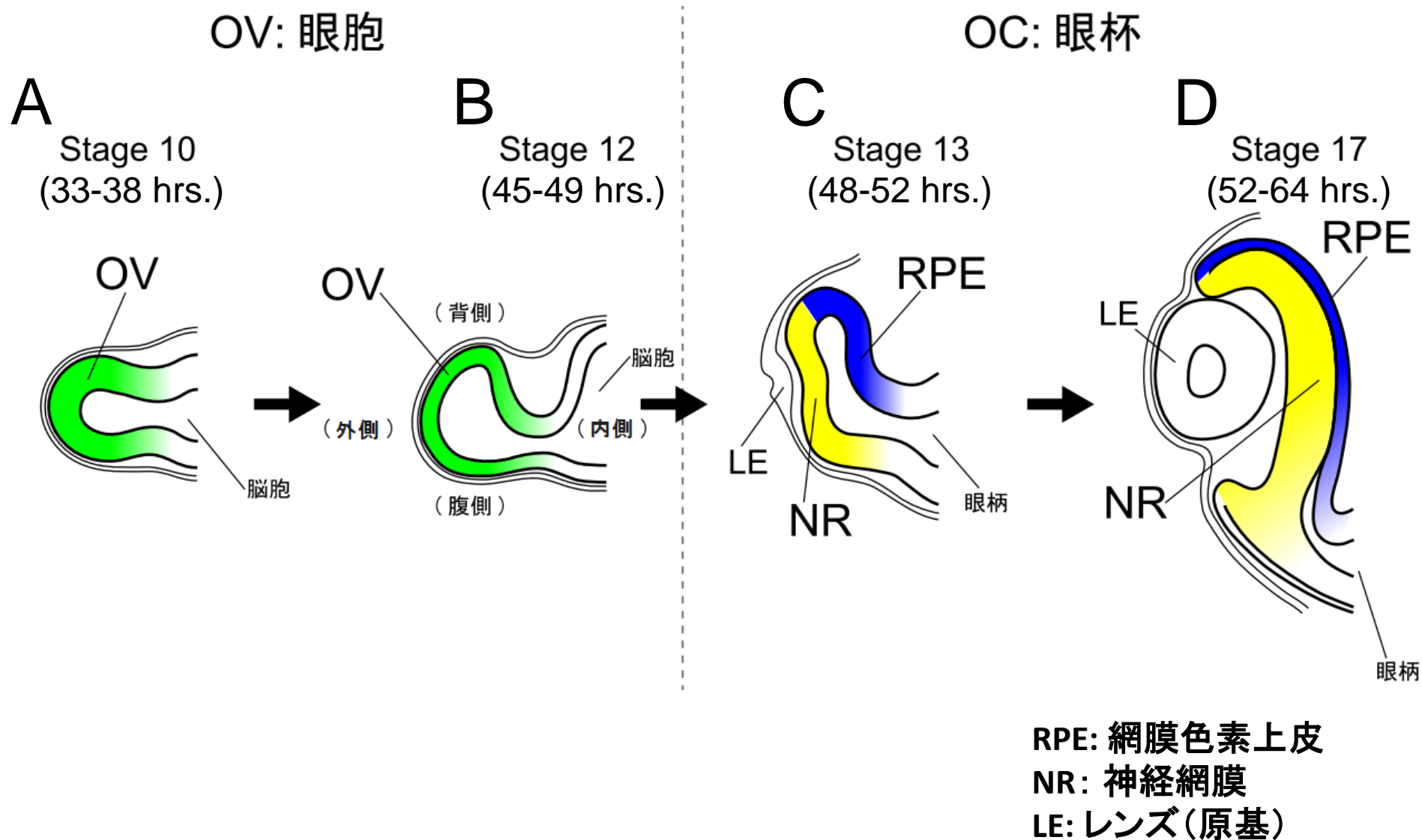
- degeneration with a still unknown genetic defect. *Acta Anat (Basel)* 162:101-111.
- Sugasawa K., Deguchi J., Okami T., Yamamoto A., Omori K., Uyama M. and Tashiro Y. (1994) Immunocytochemical analyses of distributions of Na, K-ATPase and GLUT1, insulin and transferrin receptors in the developing retinal pigment epithelial cells. *Cell Struct Funct* 19:21-28.
- Tsukiji N., Nishihara D., Yajima I., Takeda K., Shibahara S. and Yamamoto H. (2009) Mitf functions as an in ovo regulator for cell differentiation and proliferation during development of the chick RPE. *Dev Biol* 326:335-346.
- Tzoulaki I, White IM, Hanson IM. (2005) PAX6 mutations: genotype-phenotype correlations. *BMC Genet.* 26:6:27.
- Walther C. and Gruss P. (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113:1435-1449.
- Westenskow P., Piccolo S., and Fuhrmann S. (2009) Beta-catenin controls differentiation of the retinal pigment epithelium in the mouse optic cup by regulating Mitf and Otx2 expression. *Development.* 136, 2505-10.
- Xu H.E., Rould M.A., Xu W., Epstein J.A., Maas R.L., Pabo C.O.. (1999) Crystal structure of the human Pax6 paired domain-DNA complex reveals specific roles for the linker region and carboxy-terminal subdomain in DNA binding. *Genes Dev.* 13, 1263-75
- Xu W., Rould M.A., Jun S., Desplan C., Pabo CO.(1995) Crystal structure of a paired domain-DNA complex at 2.5 Å resolution reveals structural basis for Pax developmental mutations. *Cell.* 80, 639-50.
- Yamaguchi Y., Sawada J., Yamada M., Handa H., Azuma N. (1997) Autoregulation of Pax6 transcriptional activation by two distinct DNA-binding subdomains of the paired domain. *Genes Cells.* 2, 255-61.
- Yao H., Li H., Yang S., Li M., Zhao C., Zhang J., Xu G.,and Wang F. (2016) Inhibitory Effect of Bone Morphogenetic Protein 4 in Retinal Pigment Epithelial-Mesenchymal Transition. *Sci Rep.* 6, 32182.

## 図とその説明

## Figure 1 ニワトリ胚の眼の形態形成

ニワトリ胚の Stage 10、12、13、17 (Hamburger and Hamilton の発生段階表)における発生中の眼の断面図。片目の OV から OC への形態変化を示す。模式図の上が胚の背側、下が腹側、左が胚の外側（正中線から遠い側）、右が胚の内側（正中線から近い側）に対応する。(A) Stage 10 の OV を示した図。Stage 10（孵卵開始 33-38 時間）では、OV は脳胞の側面が膨張してできた袋状の構造で、眼胞と脳胞の間がややくびれる。(B) Stage 12（孵卵開始 45-49 時間）の OV を示した図。OV が大きく膨らみ、眼胞と脳胞の連絡部分が明確にくびれる。(C) Stage 13（孵卵開始 48-52 時間）の OC を示した図。外層（予定 RPE 領域）と内層（予定 NR 領域）の 2 層構造である。OC と脳胞をつなぐ部分は眼柄である。さらに表皮外胚葉を起源とするレンズ（原基）が観察される。(D) Stage 17（孵卵開始 52-64 時間）の OC を示した図。OC 外層（予定 RPE 領域）は厚く、OC 内層（予定 NR 領域）は厚い構造である。OC 外層（予定 RPE 領域）と OC 内層（予定 NR 領域）が密着している。OC と脳胞をつなぐ部分は眼柄である。レンズ（原基）の形態が変化し、レンズ胞が形成される。

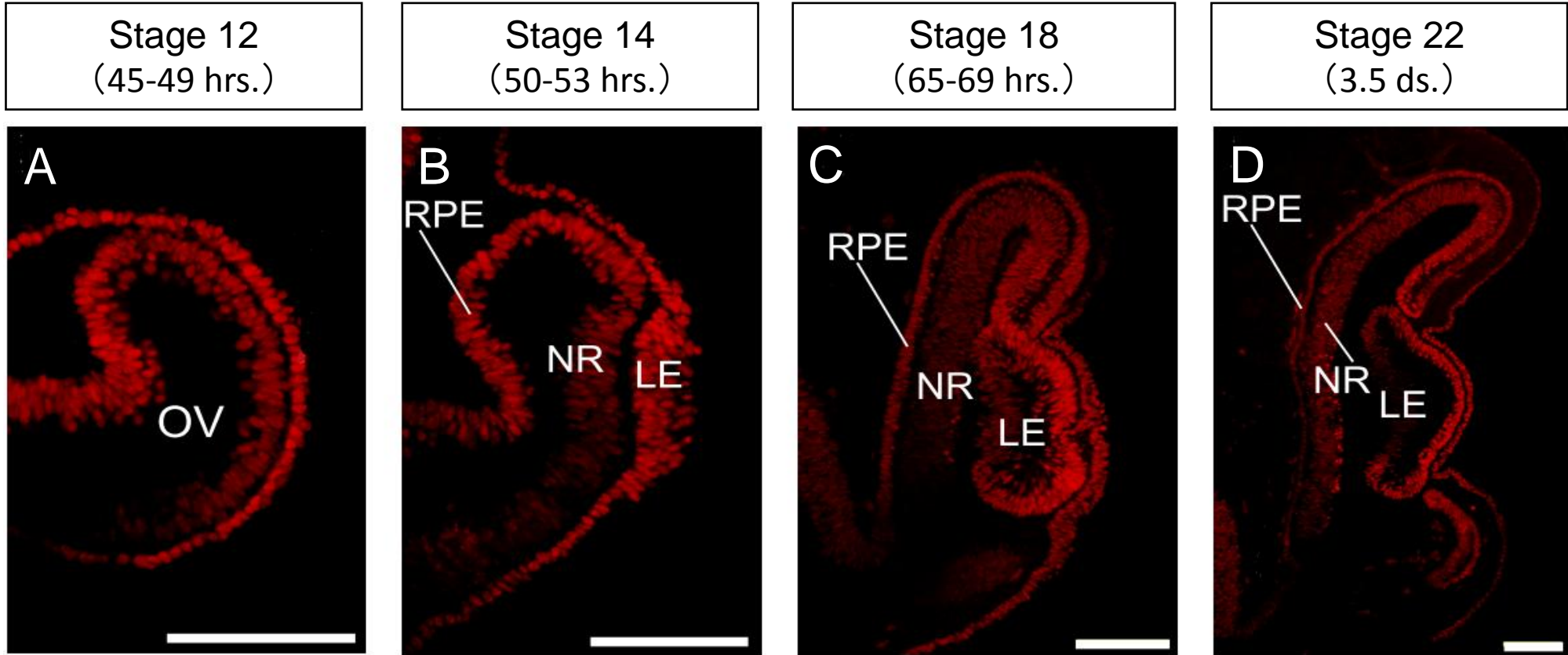
Figure 1



**Figure 2** 発生中のニワトリ胚の眼における Pax6 の発現パターン

正常発生した Stage 12、14、18、22 のニワトリ胚の眼の切片を用いた Pax6 の発現パターンの解析。A が Stage 12（孵卵開始 45-49 時間）、B が Stage 14（孵卵開始 50-53 時間）、C が Stage 18（孵卵開始 65-69 時間）、D が Stage 22（孵卵開始 3.5 日）の胚の眼。Stage 12 のみ OV で、その他は OC。（A-D）免疫組織化学染色法による Pax6 の発現パターン。Pax6 は赤のシグナルで示しており、RPE と NR の領域化が進行していく中でも変わらず発現し続ける。OV：眼胞、SE：表皮外胚葉、RPE：OC 外層／予定 RPE 領域、NR：OC 内層／予定 NR 領域、LE：レンズ。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

Figure 2



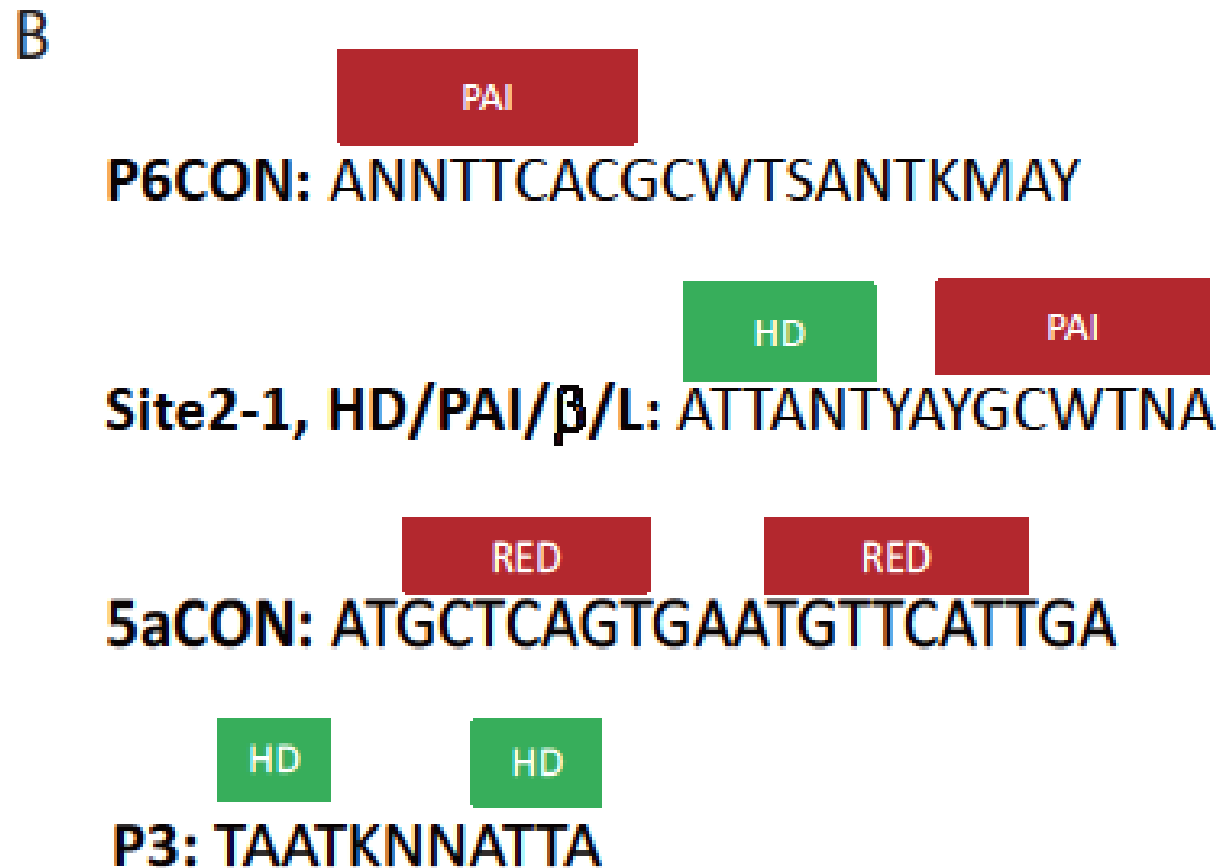
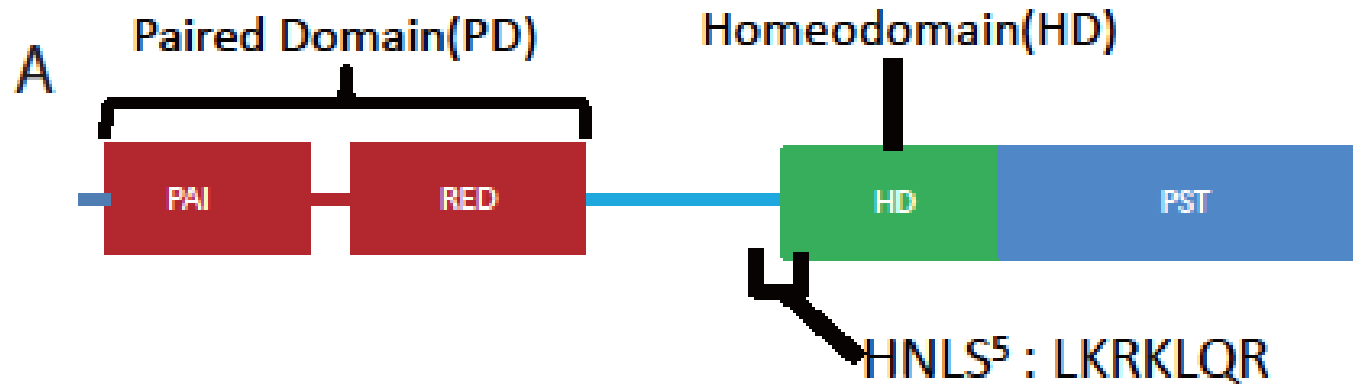
**Figure 3** Pax6 の構造模式図とシスエレメントへの 4 つの結合様式

A) Pax6 の構造模式図。HNLS<sup>5</sup> は HD 内在性の NLS を指す。

B) Pax6 の認識するシスエレメントとそれに結合する DNA 結合ドメインの模式図



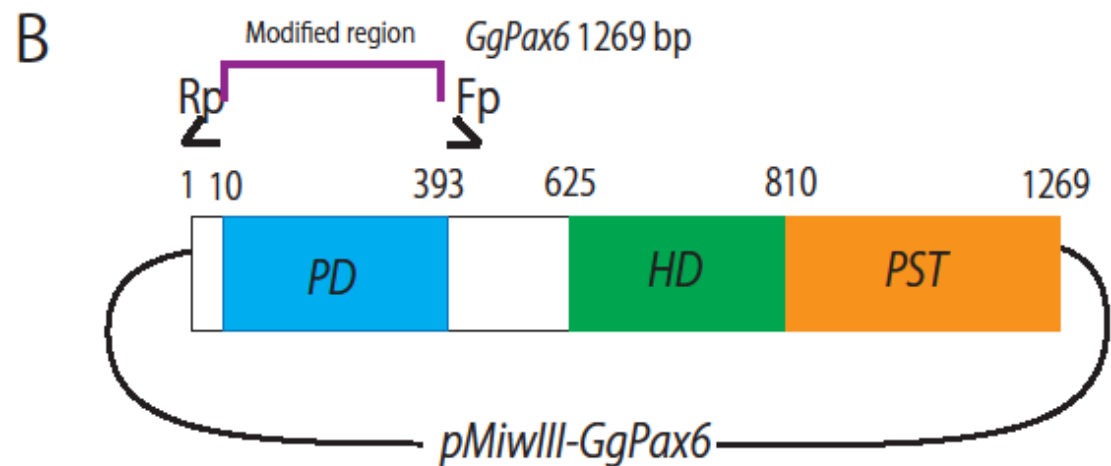
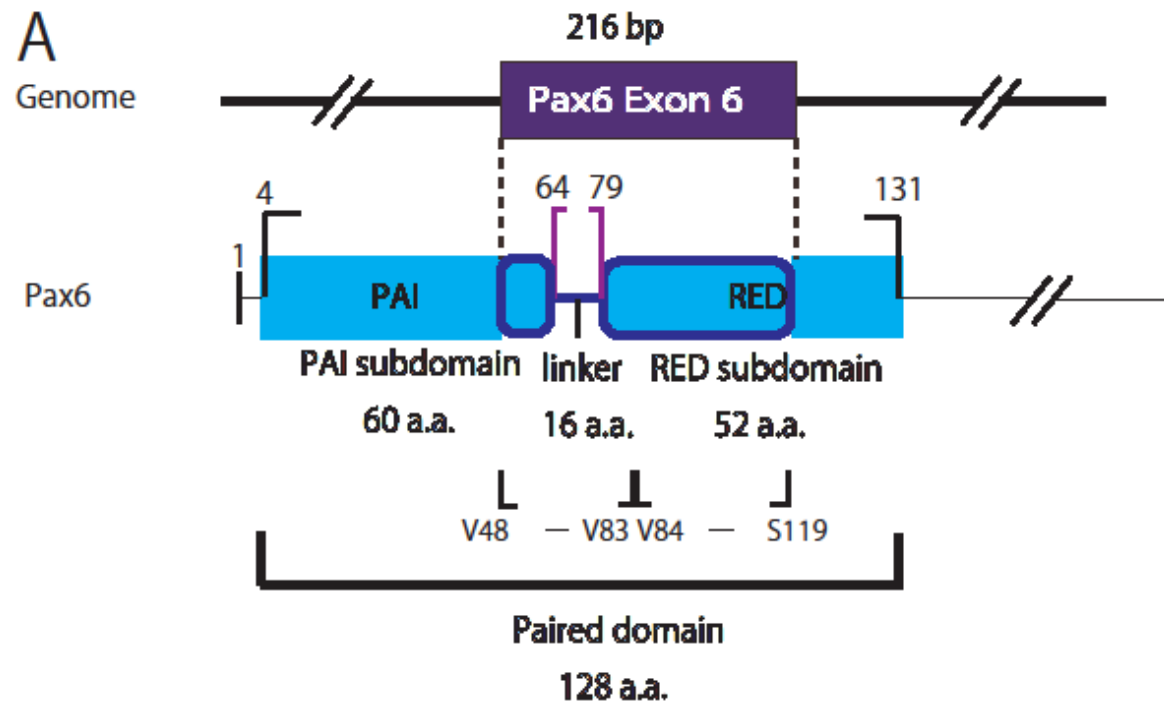
Figure 3



**Figure 4 PD の詳細な構造模式図とインバース PCR の模式 図**

- A) Pax6 がコードする DNA 結合ドメインの 1 つである PD の構造。N 末端側を PAI サブドメイン、C 末端側を RED サブドメインといい、2 つのサブドメインをつなぐ非機能領域 linker 部位から PAI-RED ドメインは構成されている。
- B) pMiwIII にニワトリの Pax6 を挿入し、それをインバース PCR によって改変する際の模式図。図では PD を失う形で改変が行われる。改変に用いた primer set は Table.1 に示した

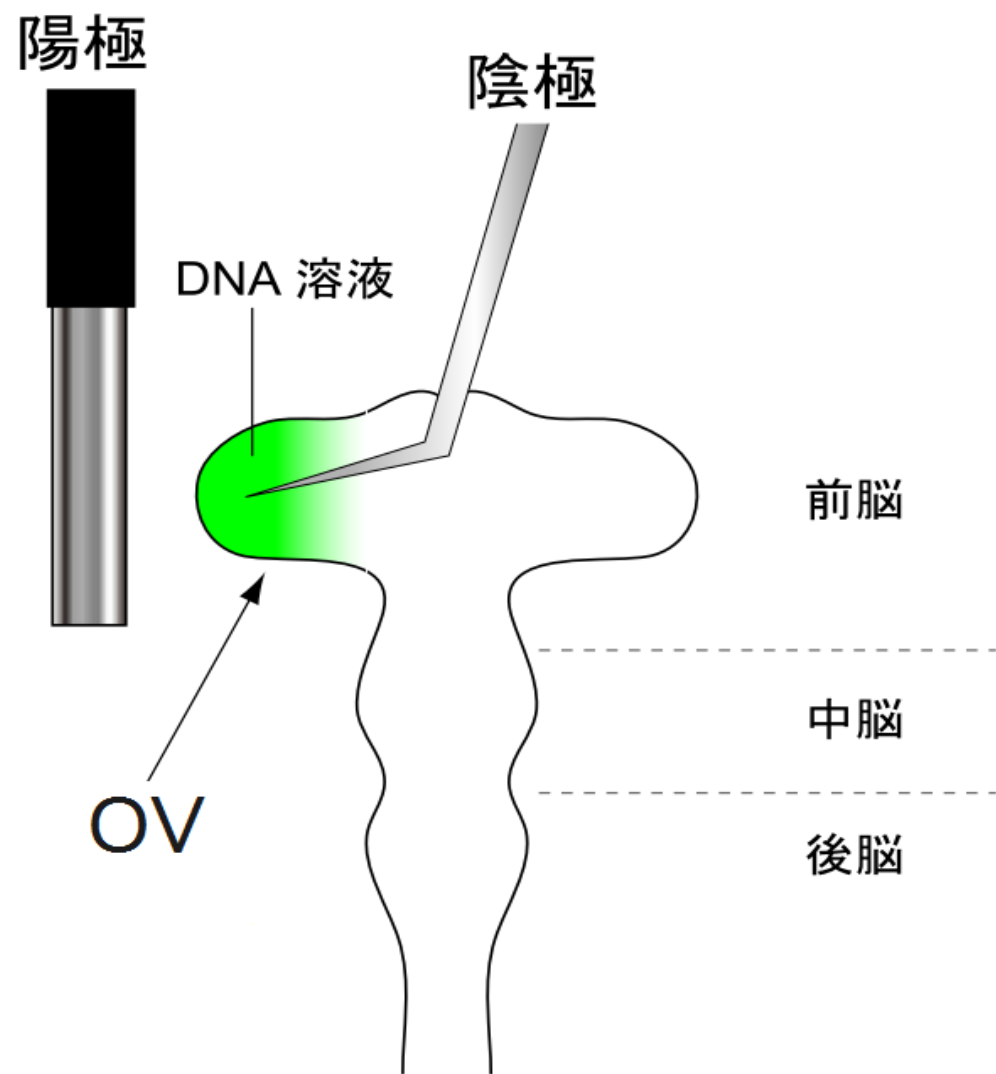
Figure 4



### Figure 5 OV へのエレクトロポレーション

Stage 10 のニワトリ胚を背側から見た模式図とエレクトロポレーションの際の電極の配置。片方の OV に発現コンストラクトを含む DNA 溶液を注入する。OV および表皮外胚葉を挟むように、陰極を OV 内部に、陽極を胚の外側に配置する。この状態で通電し、遺伝子導入を行う。

Figure 5



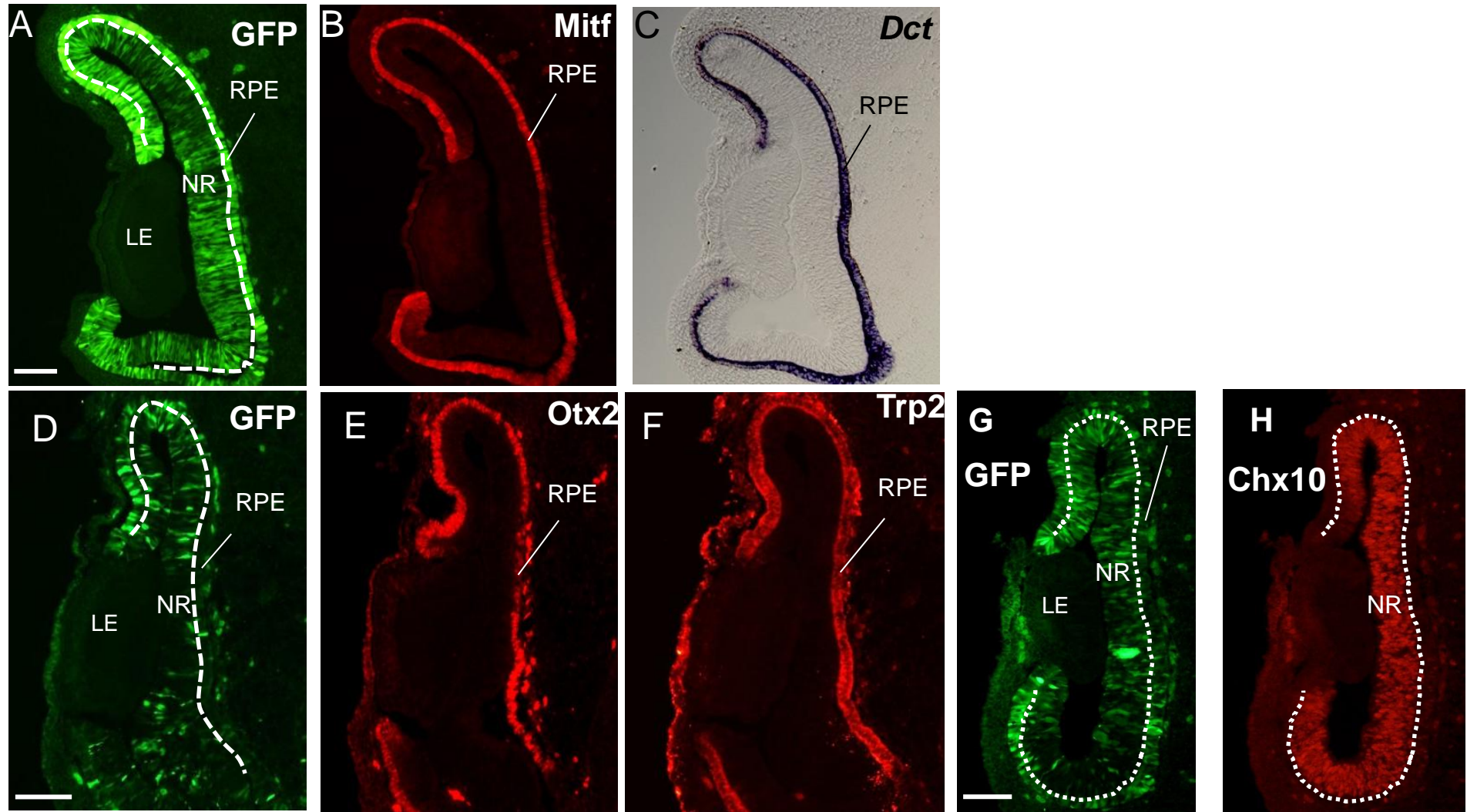
**Figure 6** 正常眼(control)での遺伝子発現パターンと形態

免疫組織化学染色法と *in situ* ハイブリダイゼーション法による、遺伝子の発現パターンの解析。(A-I) 空ベクターを導入された眼の切片。A と B、D と E、H と I はそれぞれに同一切片。C と F は A と B、G は D と E の隣接切片。A、D、H、I の破線は、OC 外層/予定 RPE 領域と OC 内層/予定 NR 領域との境界を示す。A は GFP のシグナル (緑)、B は *Mitf* の発現 (赤)、C は *Dct* の発現 (紫) を示す。D は GFP のシグナル (緑)、E は *Otx2* の発現 (赤) である。F は *Trp2* の発現 (赤) を示す。G は GFP のシグナル (緑) と *Chx10* のシグナル (赤) を示す。

RPE : OC 外層／予定 RPE 領域、NR : OC 内層／予定 NR 領域、LE : レンズ。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

Figure 6

Control



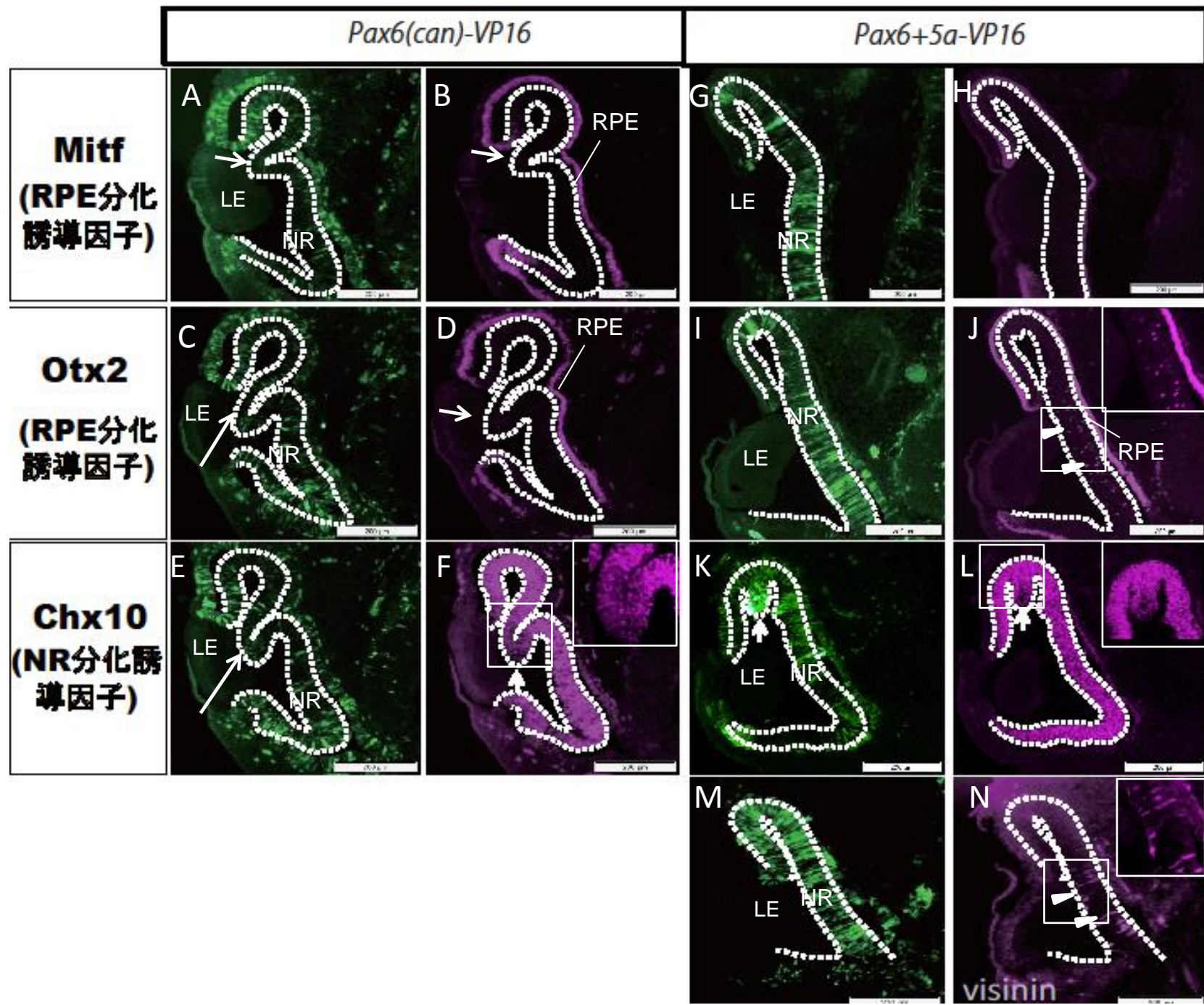
**Figure 7** 機能亢進型 *Pax6 isoform* の遺伝子導入による眼での遺伝子発現パターンの変化

免疫組織化学染色法による遺伝子発現パターンの解析。(A-F) *Pax6can-VP16* を導入された眼の切片。A と B、C と D、E と F は同一切片でそれぞれが隣接切片。破線に囲まれた部分は OC 内層/予定 NR 領域を示し、矢印は OC 内装/予定 NR 領域での細胞増殖を示す。A,C,E は GFP のシグナル (緑)、B は *Mitf* の発現 (マゼンタ)、D は *Otx2* の発現 (マゼンタ)、F は *Chx10* の発現 (マゼンタ) を示す。

(G-N) *Pax6+5a-VP16* を導入された眼の切片。G と H、I と J、K と L、M と N は同一切片。破線に囲まれた部分は OC 内層/予定 NR 領域を示し、矢印は OC 内層/予定 NR 領域での細胞の隆起を示す。G,I,K,M は GFP のシグナル (緑)、H は *Mitf* の発現 (マゼンタ)、J は *Otx2* の発現 (マゼンタ) を示し、矢頭は OC 内層/予定 NR 領域での *Otx2* の発現を示す。L は *Chx10* のシグナル (マゼンタ) を示す。N は視細胞の 1 種である錐体細胞のマーカである *Visinin* の発現 (マゼンタ) を示す。RPE : OC 外層/予定 RPE 領域、NR : OC 内層/予定 NR 領域、LE : レンズ。白い四角は右上に拡大した部分。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。



Figure 7



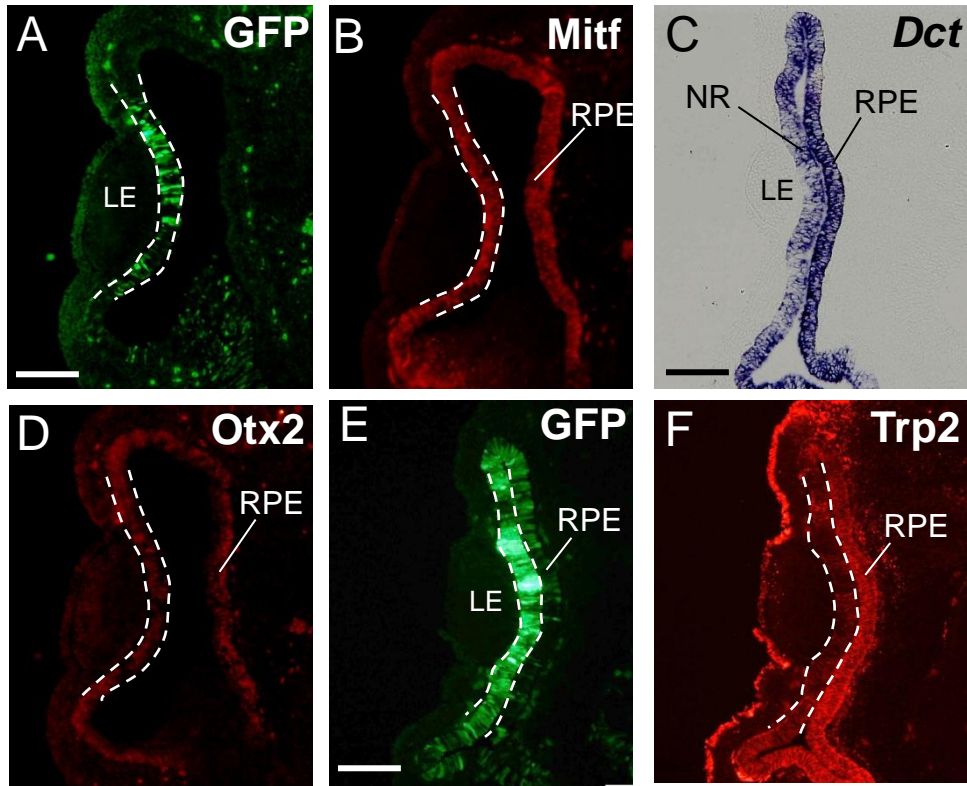
**Figure 8** 改変型 *Pax6* の遺伝子導入による遺伝子発現パターンの変化

免疫組織化学染色法と *in situ* ハイブリダイゼーション法による、OC 遠位領域の遺伝子の発現パターンの解析。(A-F) *Pax6-ΔHD-VP16* を導入された眼の切片。A と B と D, C と E と F はそれぞれ同一切片。C 以外の破線で挟まれた部分は、OC 内層/予定 NR 領域を示す。A は GFP のシグナル (緑)、B は *Mitf* の発現 (赤)、C は *Dct* の発現 (紫) を示す。D は *Otx2* の発現を示す(赤)。E は GFP のシグナル(緑)、F は *Trp2* のシグナルを示している(赤)。

(G-M) *Pax6-ΔPD-nls-VP16* を導入された眼の切片。G と H と I, J と K, L と M はそれぞれ同一切片。破線で挟まれた部分は、OC 内層/予定 NR 領域を示す。G は GFP のシグナル (緑)、H は *Mitf* の発現 (赤) を示す。I は *Dct* のシグナルを示す(紫)。J は GFP のシグナルを示し、K はその同一切片上での *Otx2* のシグナルを示す(赤)。L は GFP のシグナルを示し(緑)、M は *Trp2* の発現 (赤) を示す。RPE : OC 外層/予定 RPE 領域、NR : OC 内層/予定 NR 領域、LE : レンズ。スケールバーは 100 μm。

Figure 8

*Pax6-ΔHD-VP16*



*Pax6-ΔPD-nls-VP16*

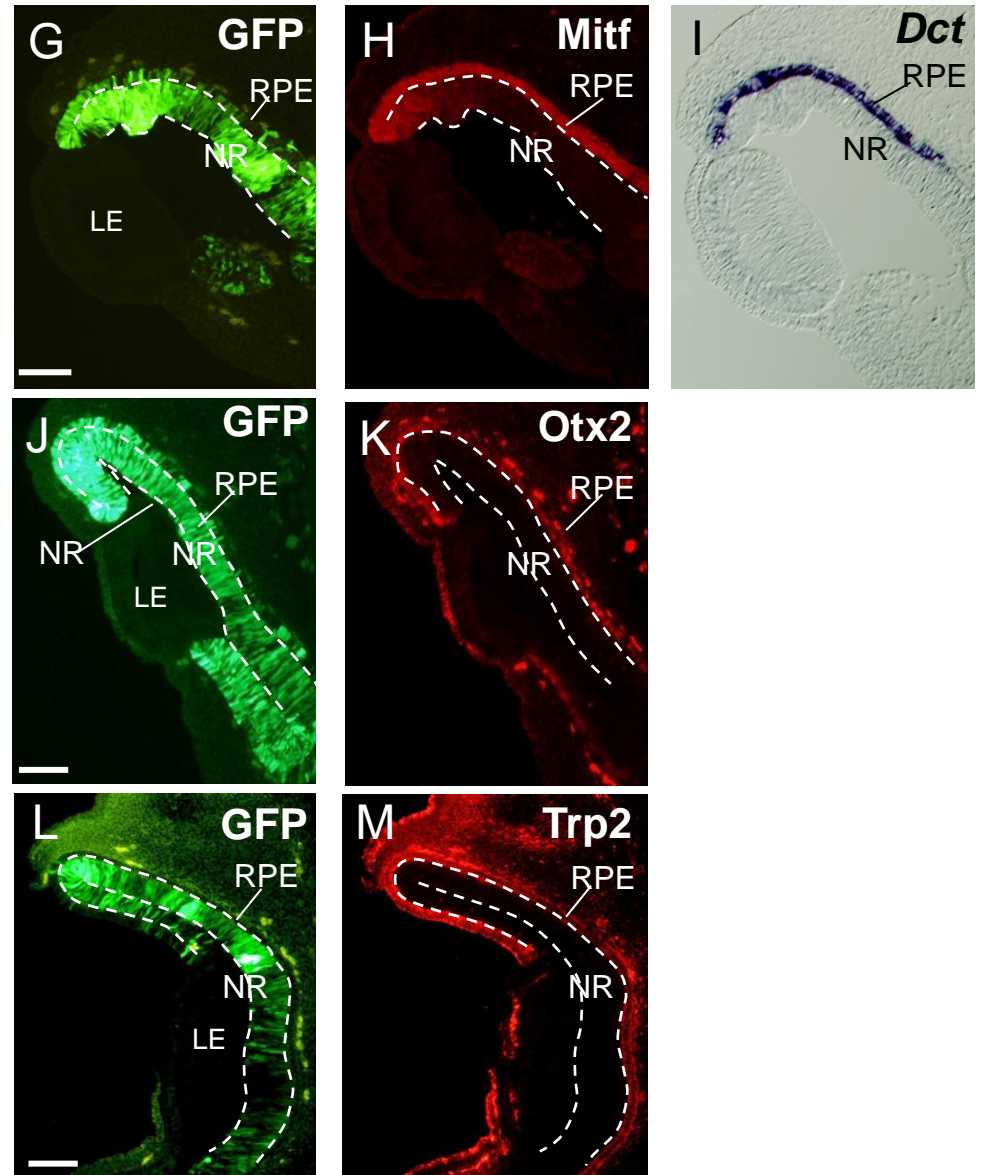


Figure 9 *Pax6-APD-nls-VP16*による *Bmp4* の発現領域の拡張

(A-B) pMiwIII の空ベクターを導入した胚の眼部切片。A と B は同一切片。A は GFP のシグナルを示し(緑)、B は *Bmp4* のシグナルを示す(紫)。

(C-D) *Pax6-APD-nls-VP16* の導入された眼の切片。C と D は同一切片で、C は GFP のシグナルを示し(緑)、D は *Bmp4* のシグナルを示す(紫)。破線で囲われた部分は OC 内層/予定 NR 領域を示す。RPE: OC 外層/予定 RPE 領域、NR: OC 内層/予定 NR 領域、LE: レンズ。スケールバーは 100  $\mu$ m。



Figure 9

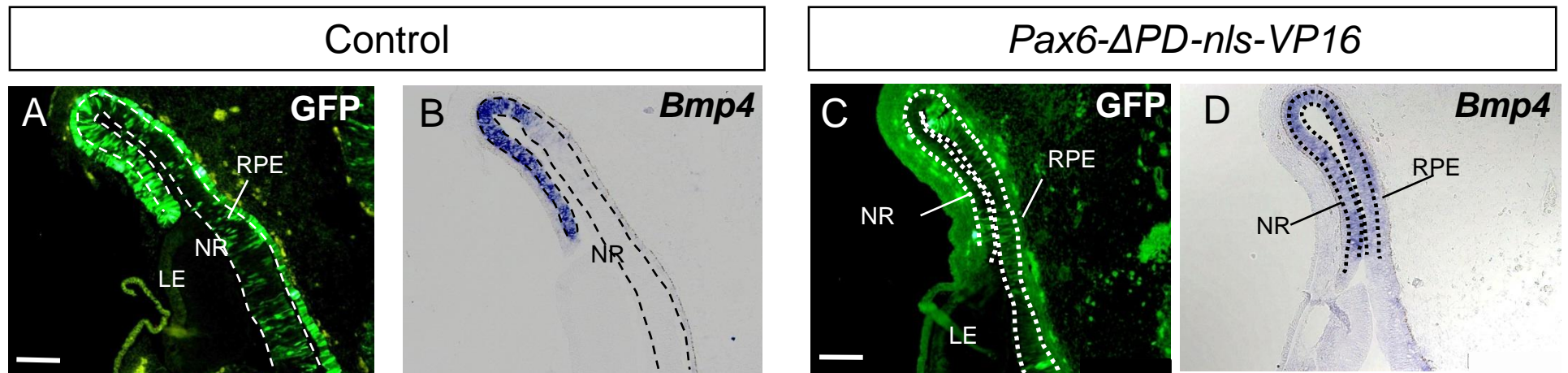
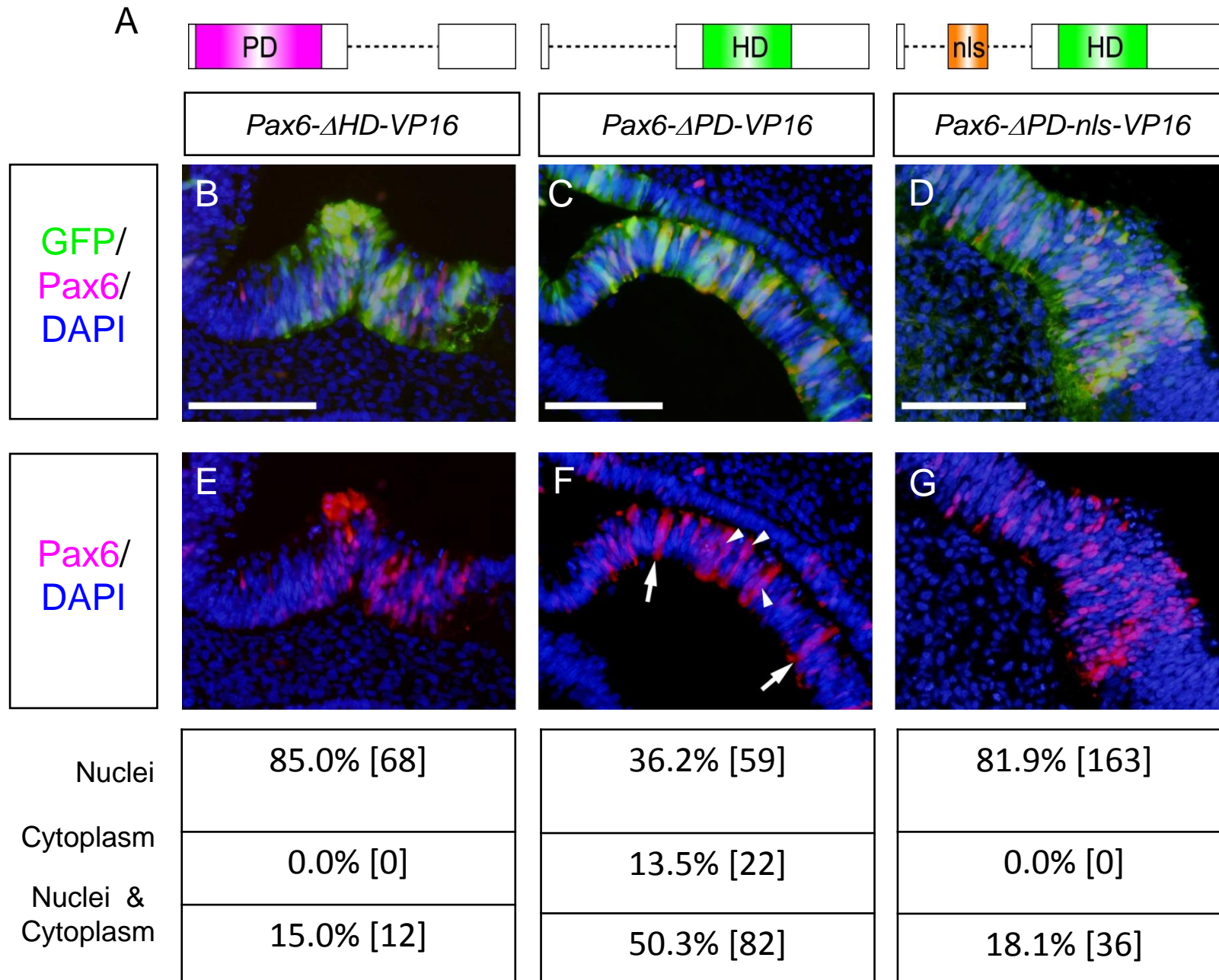


Figure 10 改変型 Pax6 の細胞内での局在

各種の改変型 Pax6 の細胞内における局在の解析。内因的な Pax6 の発現が見られない領域において、各種の改変型 Pax6 の局在の解析をした。(A) 左から順に *Pax6-ΔHHD-VP16*、*Pax6-ΔPD-VP16*、*Pax6-ΔPD-nls-VP16* のコードするタンパク質の模式図。「PD」は Paired domain、「HD」は Homeodomain、「nls」は核移行シグナルを示す。(B-G) 免疫組織化学染色法による各種の改変型 Pax6 の発現の解析。B と E は *Pax6-ΔHHD-VP16*、C と F は *Pax6-ΔPD-VP16*、D と G は *Pax6-ΔPD-nls-VP16* の遺伝子導入された組織の切片。E、F、G は Pax6 のシグナル（赤、免疫組織化学染色法によるシグナル）と DAPI による核染色（青）を重ねた図で、B、C、D はさらに GFP のシグナル（緑）も重ねた図。F の矢頭は、Pax6 陽性の細胞内で DAPI と Pax6 のシグナルが重ならない部分を示し、矢印は Pax6 陽性の細胞でかつ Pax6 と DAPI のシグナルが重なった細胞を示す。(H) 改変型 Pax6 を遺伝子導入された細胞を、Pax6 の細胞内での局在のパターンに応じて区別し、各パターンの細胞数の割合を示した表。左の列から順に、*Pax6-ΔHHD-VP16*、*Pax6-ΔPD-VP16*、*Pax6-ΔPD-nls-VP16* の遺伝子導入されたケースを示す。表の上段は Pax6 シグナルが核のみに見られた細胞 (Nuclei)、中段は細胞質のみに見られた細胞 (cytoplasm)、下段は核と細胞質の両方に見られた細胞 (Nuclei & cytoplasm) の数を示し、括弧内の数値は実際に計測した細胞数を示す。スケールバーは 100 μm、個体数  $N \geq 3$ 、1 個体中の計測した細胞数 cells > 20。

Figure 10

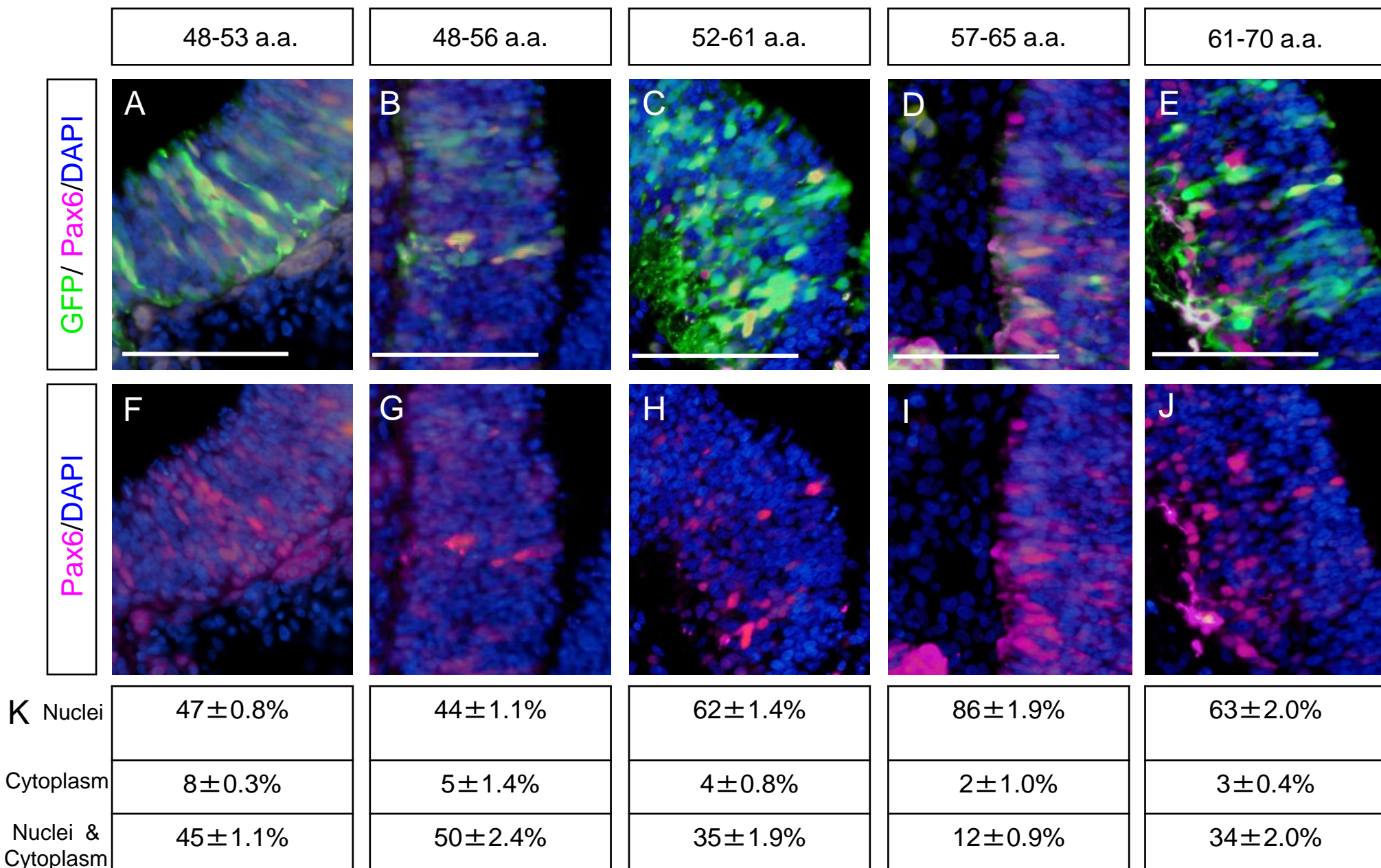


**Figure 11 改変型 Pax6 を用いた核移行シグナル領域の探索**

断片化した nls 領域を付加した改変型 Pax6 の細胞内における局在の解析。内因的な Pax6 の発現が見られない領域において、断片化した nls 領域を付加した改変型 Pax6 を用いて Pax6 の局在の解析をした。(A-J) 免疫組織化学染色法による改変型 Pax6 の発現の解析。A と F は 48-53 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、B と G は 48-56 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、C と H は 52-61 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、D と I は 57-65 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、E と J は 61-70 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6 の遺伝子導入された組織の切片。F、G、H、I、J は、Pax6 のシグナル（マゼンタ、免疫組織化学染色法によるシグナル）と DAPI による核染色（青）を重ねた図。A、B、C、D、E は、さらに GFP のシグナル（緑）も重ねた図。(K) 各種の改変型 Pax6 を遺伝子導入された細胞を、Pax6 の細胞内での局在のパターンに応じて区別し、各パターンの細胞数の割合を示した表。左のカラムから、48-53 番目のアミノ酸配列に相当する領域を付加した改変型 Pax6、48-56 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、52-61 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、57-65 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、61-70 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6 の遺伝子導入されたケースを示す。表の上段は Pax6 シグナルが核のみに見られた細胞数 (Nuclei)、中段は核と細胞質の両方に見られた細胞数 (Nuclei & Cytoplasm)、下段は細胞質のみに見られた細胞数 (Cytoplasm) の割合を示す。表の数値は mean  $\pm$  SD を示す。個体数 N>3、1 個体中の計測した細胞数 cells>60、スケールバーは 100  $\mu$ m。



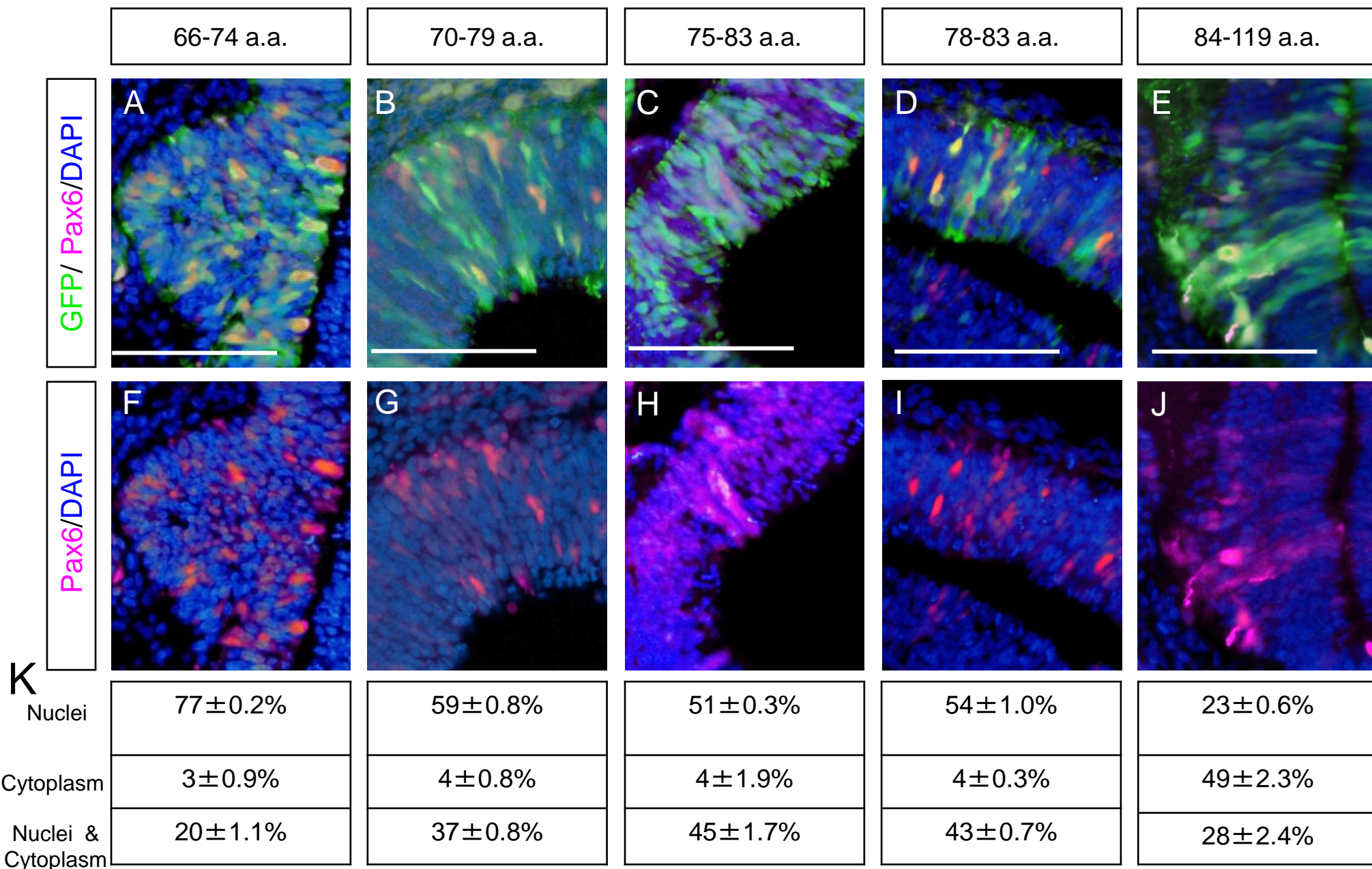
Figure 11



## Figure 12 改変型 Pax6 を用いた核移行シグナル領域の探索

Figure 12 と同様に、断片化した nls 領域を付加した改変型 Pax6 の細胞内における局在の解析。内因的な Pax6 の発現が見られない領域において、断片化した nls 領域を付加した改変型 Pax6 を用いて Pax6 の局在の解析をした。(A-J) 免疫組織化学染色法による改変型 Pax6 の発現の解析。A と F は 66-74 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、B と G は 70-79 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、C と H は 75-83 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、D と I は 78-83 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、E と J は 84-119 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6 の遺伝子導入された組織の切片。F、G、H、I、J は、Pax6 のシグナル（マゼンタ、免疫組織化学染色法によるシグナル）と DAPI による核染色（青）を重ねた図。A、B、C、D、E は、さらに GFP のシグナル（緑）も重ねた図。(K) 各種の改変型 Pax6 を遺伝子導入された細胞を、Pax6 の細胞内での局在のパターンに応じて区別し、各パターンの細胞数を示した表。左のカラムから、66-74 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、70-79 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、75-83 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、78-83 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6、84-119 番目のアミノ酸に相当する領域を付加した改変型 Pax6 の遺伝子導入されたケースを示す。表の上段は Pax6 シグナルが核のみに見られた細胞数 (Nuclei)、中段は核と細胞質の両方に見られた細胞数 (Nuclei & Cytoplasm)、下段は細胞質のみに見られた細胞数 (Cytoplasm) の割合を示す。表の数値は mean  $\pm$  SD を示す。個体数 N>3、1 個体中の計測した細胞数 cells>60、スケールバーは 100  $\mu$ m。

Figure 12



### Figure 13 改変型 Pax6 を用いた核移行シグナル領域の探索

Figure 12 と 13 で得られた、断片化した nls 領域を付加した改変型 Pax6 の細胞内における局在パターンの割合を示したグラフ。横軸は、断片化した nls 領域を付加した各種の改変型 Pax6 を示し、左から 48-53 番目のアミノ酸配列、48-56 番目のアミノ酸配列、52-61 番目のアミノ酸配列、57-65 番目のアミノ酸配列、61-70 番目のアミノ酸配列、66-74 番目のアミノ酸配列、70-79 番目のアミノ酸配列、75-83 番目のアミノ酸配列、78-83 番目のアミノ酸配列、84-119 番目のアミノ酸配列をそれぞれ付加した改変型 Pax6 を示す。縦軸は、Pax6 の細胞内における局在パターンの割合を示す。グラフの青色の系列は Pax6 シグナルが核のみに見られた細胞数の割合 (Nuclei)、赤色の系列は核と細胞質の両方に見られた細胞数の割合 (Nuclei & Cytoplasm)、緑色の系列は細胞質のみに見られた細胞数の割合 (Cytoplasm) の解析対象の全細胞数に対する割合を示す。それぞれのグラフのバーは mean  $\pm$  SD を示す。表の下に示したアミノ酸配列は、NLS 活性の見られた領域のアミノ酸配列であり、さらにその下に示しているのは、Pax6 の構造上でどの部分に相当するかを示し、 $\alpha 3$  は PD 内の FirstMet から数えて 3 つ目の  $\alpha$  ヘリックスであることを示し、 $\alpha 4$  もそれに準じる。



Figure 13

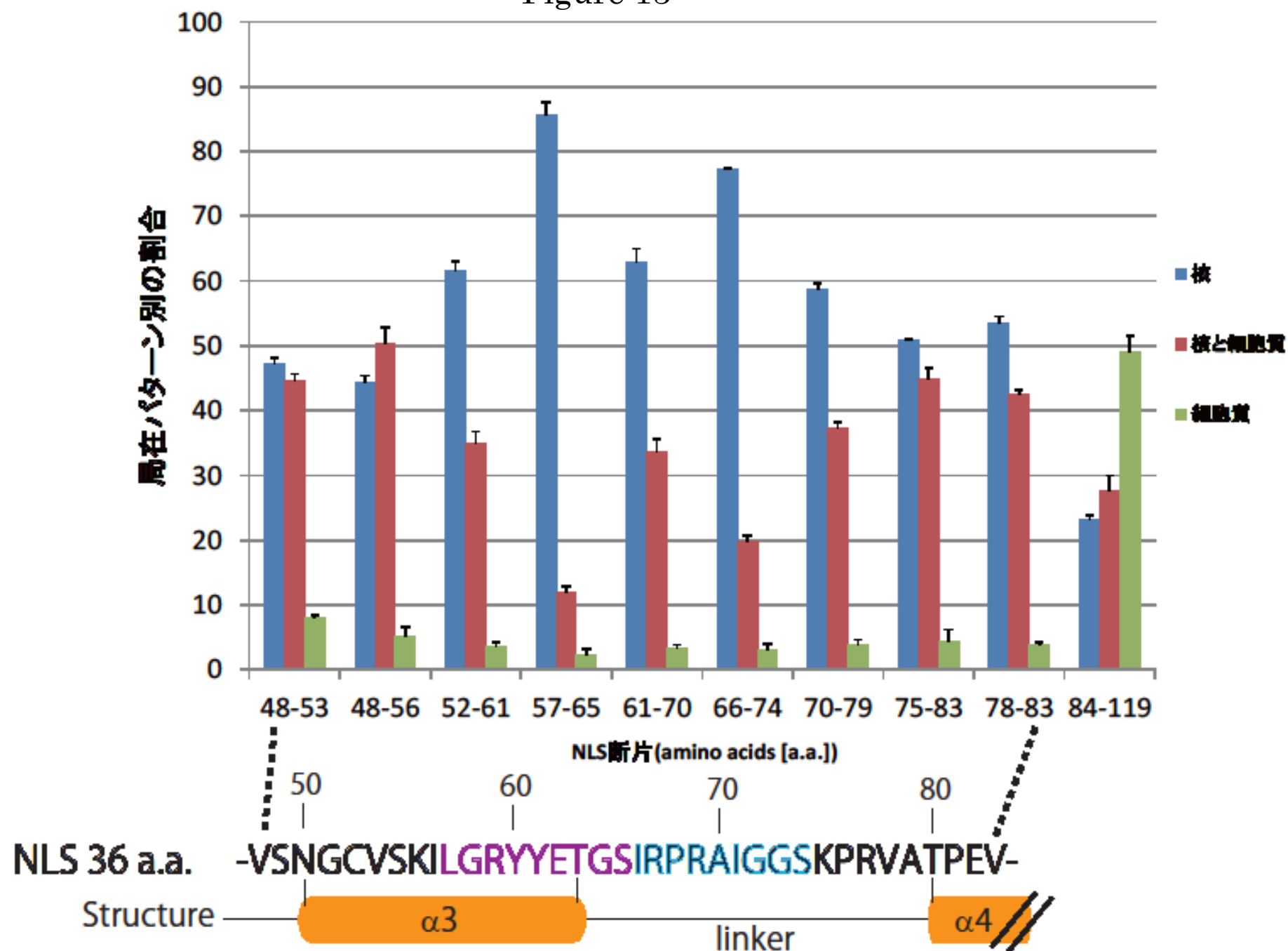


Table 1   inversPCR に用いた PCR primer set

Table 1

Table1. primer sets used to produce modified Pax6

Modified Pax6	Template	Primer set
Pax6-ΔPD	<i>pMiwIII-Pax6</i>	Fp- ACTGTTCTGCATGGTGGC Rp- AGCGAAAAGCAACAGATGG
Exon6 N-terminal Pax6-NLS <sup>V48-V83</sup>	<i>pMiwIII-Pax6</i> (fragment inserted into <i>pMiwIII-Pax6-ΔPD</i> )	Fp- tcgAAGCTTGCCACCATGCAGAACAGTGTGTCGAATGGATGTGTGAGTA AAATTTTG Rp- CTAGCTAGCAACTTCGGGAGTCGCTACTCTCG
Exon6 C-terminal Pax6-NLS <sup>V84-S119</sup>	<i>pMiwIII-Pax6</i> (fragment inserted into <i>pMiwIII-Pax6-ΔPD</i> )	Fp- tcgAAGCTTGCCACCATGCAGAACAGTGTGTCGAATGGATGTGTGAGTA AACGAGAGTG Rp- CTAGCTAGCAACTTCGGGAGTCGCTACTCTCG
Pax6-NLS <sup>V48-S65</sup>	<i>pMiwIII-Pax6-NLS<sup>V48-V83</sup></i>	Fp- AGCGAAAAGCAACAGATGGGTGCCGAC Rp- AGTAAATTTTGGGCAGGTATTACGAAAAGTGGCTCC
Pax6-NLS <sup>I66-V83</sup>	<i>pMiwIII-Pax6-NLS<sup>V48-V83</sup></i>	Fp- CCGCCACCATGCAGAACAGT Rp- ATCAGGCCAGGGCGAT
Pax6-NLS <sup>V48-V53</sup>	<i>pMiwIII-Pax6-NLS<sup>V48-S65</sup></i>	Fp- AGCGAAAAGCAACAGATGGGTGC Rp- CACACATCCATTCGACACACTGTTCT
Pax6-NLS <sup>V48-I56</sup>	<i>pMiwIII-Pax6-NLS<sup>V48-S65</sup></i>	Fp- AGCGAAAAGCAACAGATGGG Rp- AATTTTACTCACACATCCATTCGA
Pax6-NLS <sup>L57-S65</sup>	<i>pMiwIII-Pax6-NLS<sup>V48-S65</sup></i>	Fp- TTGGGCAGGTATTACGAAAAGTGGC Rp- ACTGTTCTGCATGGTGGCGG
Pax6-NLS <sup>I66-S74</sup>	<i>pMiwIII-Pax6-NLS<sup>I66-V83</sup></i>	Fp- GCTAGCGAAAAGCAACAGATGGGT Rp- ACTACCTCCGATCGCCCTGG
Pax6-NLS <sup>K75-V83</sup>	<i>pMiwIII-Pax6-NLS<sup>I66-V83</sup></i>	Fp- AAGCCGAGAGTAGCGACTCCC Rp- ACTGTTCTGCATGGTGGCGG
Pax6-NLS <sup>V78-V83</sup>	<i>pMiwIII-Pax6-NLS<sup>I66-V83</sup></i>	Fp- GTAGCGACTCCCGAAGTTGCTAGC Rp- ACTGTTCTGCATGGTGGCGG
Pax6-NLS <sup>C52-Y61</sup>	<i>pMiwIII-Pax6-NLS<sup>V48-S65</sup></i>	Fp1- TGTGTGAGTAAAAATTTGGGCAGGT Rp1- ACTGTTCTGCATGGTGGCGG Fp2- AGCGAAAAGCAACAGATGGGTG Rp2- GTAATACCTGCCCCAAAATTTTACTCA
Pax6-NLS <sup>Y61-A70</sup>	<i>pMiwIII-Pax6-NLS<sup>V48-V83</sup></i>	Fp1- TACGAAAAGTGGCTCCATCAGGC Rp1- ACTGTTCTGCATGGTGGCGG Fp2- GCTAGCGAAAAGCAACAGATGGGT Rp2- CGCCCTGGGCTGATGGA
Pax6-NLS <sup>A70-A79</sup>	<i>pMiwIII-Pax6-NLS<sup>I66-V83</sup></i>	Fp1- GCGATCGGAGGTAGTAAGCCGAG Rp1- ACTGTTCTGCATGGTGGCGG Fp2- GCTAGCGAAAAGCAACAGATGGGT Rp2- CGCTACTCTCGGCTTACTACCTCCG