

「生物の発生・分化・再生」

平成 13 年度採択研究代表者

野田 昌晴

(岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 教授)

「網膜内領域特異化と視神経の発生・再生機構」

1. 研究実施の概要

発生過程における網膜内領域特異化の分子機構は、その後起こる視神経の視中枢への領域特異的神経結合形成の基盤である。我々は発生期ニワトリ網膜において、前後軸あるいは、背腹軸方向に発現量の異なる分子の網羅的スクリーニングを行い、総計 53 分子を同定した。本研究では、これらニワトリ網膜から同定した分子群の機能解析を通して、網膜内領域特異化から領域特異的神経結合形成に至る分子機構の全容を解明することを第一の目標とする。さらに、視神経の再生可能なキンギョと再生不可能なマウスを用いて、視神経切断後最初に起こる遺伝子発現変化の網羅的解析を行い、その違いを明らかにする。ここでは特に、切断後、視神経を再伸長に向かわせるために必須であるマスター遺伝子の同定とその機能解明を目指す。

本年度は、ニワトリで同定された 53 分子とそれに関連する分子について解析を進めた。その結果、Ventroptin と前後軸方向で拮抗する未知の TGF- β ファミリー分子について、いくつかの候補となる分子を得た。またレチノイン酸合成に関わると考えられる新規酵素を同定した。一方、マウス相同遺伝子の単離を精力的に進めており、新規免疫グロブリン様分子等の重要な分子について相同遺伝子の単離を完了している。さらに背側視神経のみ、あるいは腹側視神経のみでマーカー分子を発現する TG マウスの作製に成功しており、マウスにおける効率的な解析に向けて着実に準備が整いつつある。今後、KO マウスや TG マウスの作製やマーカー分子を発現する TG マウスとの交配を通して、各分子の機能の解明を行いたい。

視神経の再生研究については、基生研グループにおいて、キンギョマイクロアレイ作製のための cDNA ライブラリーの構築を開始した。今後2年間をかけて、約1万個の独立な cDNA クローンの EST データベース作製を目指す。一方、金沢大のグループでは、キンギョの視神経再生初期に Na,K-ATPase α 3 サブユニットおよびトランスグルタミナーゼの発現が上昇することを見出した。さらに視覚機能の回復について行動学的に解析する実験系の開発を行っている。この系は、将来遺伝子操作などを行ったキンギョの視神経再生の評価系として使用できると期待される。

2. 研究実施内容

網膜内領域特異化グループ

ニワトリ網膜について、既に RLCS 法により同定された、前後軸方向に 33 分子、背腹軸方向に

20 分子、合計 53 の領域特異的分子の機能と相互の関係を明らかにする。53 分子は発現パターンおよび分子構造から、A) 網膜における領域特異化、もしくは、B) 領域特異的神経結合形成のいずれかにおいて機能していると考えられるため、これら2つのカテゴリーに分けて研究を展開する。個々の分子の *in vivo* における機能はレトロウイルスベクター等の発現ベクターを用いて cDNA を異所的に強制発現させる実験、あるいは、RNAi、Ribozyme、Morpholino 等のテクニックによって発現抑制をかけたときの、他の分子の発現量や領域特異性の変化等を解析することによって行う。また、細胞下レベルの機能を明らかにするため、初代培養細胞等における各分子の挙動や、機能修飾を行った分子を発現させたときの軸索の動態について、イメージング技術を用いた解析を行う。本年度の進展は以下の通りである。

A) 網膜における領域特異化の分子機構

① Ventroptin に結合する未知の TGF- β ファミリー分子の同定

Ventroptin は発生初期に背腹軸方向において BMP-4 に拮抗し、発生後期に前後軸方向において未知の TGF- β ファミリー分子に拮抗することによって、背腹軸方向及び前後軸方向の領域特異化と領域特異的な投射形成を制御していることが推定されている。現在、前後軸方向において Ventroptin と対をなす未知の TGF- β ファミリー分子の同定を行っている。具体的には、Ventroptin が前後軸方向において勾配をなして発現している孵卵 8 日目網膜の cDNA を鋳型とし、TGF- β ファミリー分子に対する degenerate primer を用いて PCR を行った。その結果、孵卵 8 日目の網膜において BMP-4 を含む複数の TGF- β ファミリー分子の発現が確認された。今後は、これらのうちの分子が前後軸方向の領域特異化に関与するのかを明らかにして行く予定である。

② 網膜内のレチナルアルデヒド合成酵素の同定

RLCS 法により得られた分子中に short chain dehydrogenase/reductase ファミリーに属するものを見出した。これらの酵素群はアルコールとアルデヒド間の酸化・還元反応を触媒することから、この分子がレチノールをレチナルアルデヒドに変換する酵素である可能性が高いと考えている。また本分子は発生の進行とともに発現分布がダイナミックに変化することから、その役割が注目される。

B) 領域特異的神経結合形成の分子機構

① 受容体型プロテインチロシンホスファターゼ

網膜の神経節細胞において領域特異的に発現する受容体型プロテインチロシンホスファターゼの RPTP ϕ と CRYP-2 に加えて、リガンドである pleiotrophin が領域特異的に発現する PTP ζ について解析を行っている。PTP ζ については遺伝子欠損マウスを作成済みであり、視神経のみならず、他の中枢神経系、あるいは末梢組織における PTP ζ の機能を解析することによって、PTP ζ のシグナル伝達機構を明らかにする。

本年度、PTP ζ 欠損マウスにおいては、ヘリコバクター・ピロリ菌が分泌する細胞空胞化毒素 VacA によって、胃潰瘍が惹起されないことを見いだした。この時、PTP ζ 欠損細胞においても VacA の細胞内取込みと空胞化は生じていた。再構成基底膜 Matrigel 上で初代培養した胃上皮細胞を用いて VacA の作用を検討した結果、野生型由来の細胞では VacA 刺激により細胞シー

トが徐々に剥離するが、PTP ζ を欠損した細胞では、そのような剥離が起こらないことが判明した。これら結果は、VacAによる胃潰瘍形成は、従来言われてきたようにVacAによる細胞の空胞化が原因というよりも、胃上皮細胞の細胞外マトリックスへの接着制御に関与する、PTP ζ のシグナル伝達系がVacAによって異常シグナルを受けること(VacAがPTP ζ のリガンドとして機能すること)が重要であることを示している。

② 新規免疫グロブリン分子

免疫グロブリンドメインを2個有する新規分子が、ニワトリ網膜背側由来の視神経軸索並びに成長円錐に特異的に分布することを見出している。本年度は本分子のマウス相同分子の単離を行った。構造解析の結果、タンパク質分子の全領域において、ニワトリとマウス間で高い相同性が認められた。さらにマウス網膜について *in situ hybridization* を行ったところ、ニワトリ相同分子と同様に、視神経が投射先の神経細胞と神経結合を形成している時期に、背側網膜神経節細胞に強い発現を認めた。今後、ニワトリに加えてマウスにおいても、本分子の機能解析を進める予定である。

③ 新規 CRMP 分子

CRMP (Collapsin response mediator protein) は反発因子 semaphorin の情報伝達に関わる分子として同定され、現在 CRMP1-5 の family が存在することが判明している。我々は CRMP1-4 にプロモーターの使い分けによって生じる N 末 variant が存在することを見出した。これを CRMP-As と呼び、従来のものを CRMP-Bs と呼ぶことにした。CRMP-2A と-2B を fibroblast に強制発現すると microtubule のパターンが対照的に変化することが判明した。

④ 視神経可視化マウス

マウスにおける視神経の領域特異的な投射の解析を容易にするため、背側のみ、あるいは腹側のみ視神経にレポーター分子の GAP-LacZ を発現する TG マウスを作製した。今後、様々な TG マウスあるいは KO マウスと交配させることにより、発生の各段階における視神経の伸張、領域特異的な投射及び神経結合を詳細に解析することが可能である。

視神経再生グループ

哺乳類や鳥類においては、視神経が切断されると再生が不可能であるのに対して、魚類や両生類では視神経切断後、視神経軸索は再び伸展し、トポグラフィックな投射を再生する能力を有している。

A) 基礎生物学研究所グループ

本研究においては、キンギョとマウスにおける視神経切断時の遺伝子発現パターンの変化についてマイクロアレイを用いて比較することにより、再生の最初期に機能する分子を明らかにしたい。

マウスでは既に cDNA マイクロアレイあるいはオリゴマイクロアレイが利用可能であるが、キンギョでは存在しないため、その作製から行う。まず本年度から2年間をかけて、約1万個の独立な cDNA クローンの EST データベース作製を目指す。本年度は、約 100 匹のキンギョより、cDNA ライブラリー作製の出発材料となる、視神経切断前後の網膜、脳等の組織の採取を行った。今後、引き続いて mRNA の調製、cDNA ライブラリーの作製を行う予定である。

B) 金沢大学グループ

視神経再生可能なキンギョを材料として、視神経切断から視覚機能が完全に回復するまでの神経再生過程を、①線維が伸び出す開始期、②視蓋への到達期、③視蓋における線維の再編成期の3期に区分し、それぞれに強く関与する分子の同定を分子生物学的手法により行う。これらの分子の解析を通して、視神経再生の全容を分子レベルで解明することが本研究の目的である。

本年度は、キンギョの視神経切断5日目(開始期)の網膜から cDNA ライブラリーを作製し、differential hybridization 法を用いて、正常網膜に比べて5日目網膜で特異的に mRNA の発現が増加している分子の同定を試みた。その結果、Na,K-ATPase α 3 サブユニットおよびトランスグルタミナーゼ(TG)の発現量が、視神経切断後5~10日の網膜神経節細胞(細胞体層及び視神経線維層)においてのみ増加するのが見出された。また、ノーザン法では正常対照群と比べて視神経切断群で最大2~3倍の発現量増加が確認された。さらに、Na,K-ATPase α 3 サブユニットの抗体を用いた免疫組織化学法においても mRNA の発現パターンとほぼ同様な結果が得られた。次に Na,K-ATPase α 3 サブユニットの機能について、組織培養の系を用いて解析した。5~7日前にあらかじめ視神経切断しておいた成熟キンギョより網膜片を取り出し培養系に移すと、神経節細胞から突起が伸展し *in vitro* で神経再生が再現できる。この系に低濃度のウアバイン(Na,K-ATPase α 3 拮抗剤)を添加しておく、神経突起が全く誘導されなかったが、ウアバインを洗ってやると再び突起伸展が見られた。以上より Na,K-ATPase α 3 サブユニットは視神経再生の初期伸長期に重要な役割を担っていることが示された。

一方、再生中期過程の解析から、NOS の活性が視神経の切断から25~45日にかけて網膜神経節細胞に強く発現することを見出した。今後再生中期過程におけるNOSの機能について解析を進める予定である。

さらに、行動学的な観点から視覚機能の完全な回復の追跡を行うため、キンギョの行動を画像処理装置によりモニターし、視神経切断後の異常行動の修復を追求した。その結果、キンギョの追尾行動(二尾のキンギョが互いに追いかけてながら一緒に泳ぐ行動)が視覚に大きく依存していることを見いだした。また、視神経切断後の追尾行動の回復は4~6ヵ月と長時間を要することが判明した。

3. 研究実施体制

網膜内領域特異化グループ

- ① 研究分担グループ長：野田昌晴(基礎生物学研究所・教授)
- ② 研究項目

ニワトリ及びマウス網膜において領域特異的発現する分子群の単離同定、機能解析。

視神経再生グループ

- ① 研究分担グループ長：野田昌晴(基礎生物学研究所・教授)
- ② 研究項目

金魚、マウスの視神経切断時に発現の変化する遺伝子の解析から、視神経再生のマスター遺伝子の同定。

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Zubair, M., Watanabe, E., Fukada, M. and Noda, M.
Genetic labeling of specific axonal pathways in the mouse central nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 15, 807–814, 2002.
- Thomaidou, D., Coquillat, D., Meintanis, S., Noda, M., Rougon, G. and Matsas, R.
Soluble forms of NCAM and F3 neuronal cell adhesion molecules promote Schwann cell migration: identification of protein tyrosine phosphatases ξ / β as the putative F3 receptors on Schwann cells. *J. Neurochem.* 78, 767–778, 2002.
- Liu Z.W., Matsukawa T., Arai K., Devadas M., Nakashima H., Tanaka M., Mawatari K. and Kato S.
Na,K-ATPase alpha3 subunit in the goldfish retina during optic nerve regeneration. *J. Neurochem.* 80, 763–70, 2002.
- Devadas, M., Liu, Z., Kaneda, M., Arai, K., Matsukawa, T. and Kato, S.
Changes in NADPH diaphorase expression in the fish visual system during optic nerve regeneration and retinal development. *Neurosci. Res.* 40, 359–365, 2001.
- Arai, K., Ohkuma, S., Matsukawa, T. and Kato, S.
A simple estimation of peroxisomal degradation with green fluorescent protein – an application for cell cycle analysis. *FEBS Lett.* 507, 181–186, 2001.

(2) 特許出願

なし