

「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について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、視神経が再生可能であるキンギョと再生不能であるマウスを用いて、視神経切断後の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、切断後最初に発現を開始す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分子について継続して解析を進めた。その結果、Ventreoptinと前後軸方向で拮抗するTGF- β ファミリー分子としてBMP-2を同定した。E6以降の網膜においては、VentreoptinとBMP-2が前後軸方向に相補的に発現し、ephrin-A2の領域特異的な発現を制御していることを明らかにした。また転写因子であるCBF-1が前後軸方向の領域特異化に関して決定的役割を担っており、他のトポグラフィック分子、CBF-2, SOHo-1, GH6, ephrin-A2, ephrin-A5等の領域特異的な発現を支配していることが明らかになった。さらにCBF-1の制御機構としてDNA結合依存のおよび非依存の様式が存在することが明らかになった。

視神経の再生機構研究については、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ライブラリーを構築し、この中から約2万クロンのシークエンスを行った。今後さらに2万クロンのシークエンスを行い、データベースの構築を行う。一方、金沢大学のグループでは、キンギョの視神経再生初期に発現が増加する分子としてレチノール結合タンパク及びトランスグルタミナーゼ遺伝子を同定し、その構造と機能について検討した。また、再生後期に発現が増大する分子を数個見出した。

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等を用い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に拮抗するが、発生後期に前後軸方向において拮抗する分子は不明であった。スクリーニングの結果、Ventroptinと前後軸方向で拮抗するTGF- β ファミリー分子としてBMP-2を同定した。VentroptinとBMP-2はお互いの発現を抑制することによって前後軸方向に相補的に発現し、ephrin-A2の領域特異的な発現を制御していることが明らかになった。

② CBF-1による前後軸方向の領域特異化決定機構の解明

転写因子であるCBF-1は発生初期の網膜において前後軸方向の特異性が決定される時期に先立って、網膜前側に特異的に発現を開始する。これまでに我々は、前後軸方向の投射の制御にCBF-1が重要な役割を果たしていることを明らかにしていたが、その下流遺伝子については不明であった。今回、CBF-1が前後軸方向の領域特異性の決定に関与し、CBF-2, SOHo-1, GH6, ephrin-A2, ephrin-A5の領域特異的な発現を支配していることが明らかになった。さらにCBF-1はDNAに結合して転写抑制因子として機能するだけでなく、DNAへの結合非依存的に他のシグナル伝達系（BMPシグナル伝達系等）を調節することにより機能することが明らかになった。CBF-1はこれら複数の作用様式を使い分けることで、下流遺伝子の領域特異的な発現、及び視神経の視蓋への領域特異的な投射を巧妙に制御していると考えられる。

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CRYP-2、並びに、リガンドであるpleiotrophinが領域特異的に発現するPtprzについて解析を行っている。CRYP-2については、ドミナントネガティブ型分子をニワトリ網膜に発現させると、視神経の視蓋への投射に異常が認められた。現在はこの形質発現に関与する基質分子の同定を進めており、いくつかの候補分子を得ている。

Ptprzについては、視神経に加えて、他の中枢神経系あるいは末梢組織におけるPtprzの発現と機能を解析することによって、Ptprzのシグナル伝達機構を明らかにしつつある。本年度はPtprzが胃粘膜上皮細胞に発現すること、更にヘリコバクター・ピロリ菌が分泌する細胞空胞化毒素VacAによる胃潰瘍形成においてPtprzがVacAの受容体分子として機能することを明らかにした。従来VacAによる細胞空胞化が胃潰瘍形成の主要な要因と考えられてきたが、Ptprz遺伝子欠損マウスを用いた研究により、Ptprz^{-/-}マウス由来の細胞においてもVacAによって細胞空胞化が起きるにもかかわらず、同マウスは胃潰瘍をまったく発症しないことを見出した。VacAは、Ptprzに対する外因性リガンド分子としてPtprzに結合し、Ptprzを不活化する。この結果、胃上皮細胞と細胞外マトリックス（基底膜）との接着が弱まり、細胞を剥離させてしまうことが判明した。従ってこれが胃潰瘍形成の真の初期過程と考えられる。また、Ptprz欠損マウスは覚醒剤メタンフェタミンに対して低応答性を示すことを見出しているが、その原因を明らかにするためにPtprz遺伝子欠損マウスの側坐核（線条体）のドーパミン取り込み活性を評価している。

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についてノックアウトマウスの作製を行った。まずマウスのゲノムクローンをクローニングし、それを用いてターゲティングベクターを作製した。次にES細胞にターゲティングベクターを導入することにより相同組換えESクローンを獲得し、マウス初期胚に移植することによりキメラマウスの作製を行った。現在ほぼ100%と推定されるキメラマウスを複数匹得ており、今後交配を行うことによりノックアウトマウスを作製し、形質の解析を行う。

③ 新規CRMP (Collapsin response mediator protein)分子

CRMP1~4に新たなN末variantが存在することを見出し、これらをCRMP-Asと命名し、従来のものをCRMP-Bsと呼ぶことにした。CRMP-2Aと-2Bを繊維芽細胞に強制発現させると微小管のパターンが対照的に変化した。またこれらの変化は相手方のCRMPの発現によりうち消された。また、網膜神経節細胞に発現させると、CRMP-2Bは軸索の伸張を抑制し側枝の形成を促進した。この時CRMP-2Aを共発現させるとCRMP-2Bの作用がうち消された。このように、CRMP-2AとCRMP-2Bはお互いに拮抗する機能を有していることが明らかになった。またCRMPのN末構造が機能発現に重要な役割を果たしていることが推定された。

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起こらないのに対して、魚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解析することにより、再生の最初期に機能する

分子の同定を目指している。

マウスでは既に約4万のEST情報が利用可能であるが、キンギョでは存在しないため、独自にキンギョ cDNAクローンのESTデータベース作製を目指す。本年度は、視神経切断前後の網膜、脳より調製したmRNAを用いてcDNAライブラリーの作製を行った。更に、これらのライブラリーから約2万クローンについてシーケンスを行った。今後、さらに2万クローンについてシーケンスを行い、データベースの構築を行う。

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、再生繊維の伸長、視蓋への到達期、視蓋シナプス再形成に区分し、分子生物学的手法によりそれぞれに強く関与する分子の同定を行い、視神経再生の全容を分子レベルで解明することが目的である。

本年度は、再生初期に増加する分子としてレチノール結合タンパク (RBP, 分子量21kDa)、トランスグルタミナーゼ (TG, 分子量75kDa) を同定し解析を行った。RBP mRNAは視神経切断5日にピークを示し、その局在はISH法により視細胞であることが判明した。またTG mRNAは視神経切断20日にピークを示し、神経節細胞に局在することが明らかになった。培養網膜片に両者の中和抗体を添加したところ、いずれも有意に神経突起進展が抑えられた。RBPはアミノ酸配列から分泌タンパクであると予想され、RBP組換えタンパクを培養下に添加したところ、対照群に比べて有意に神経突起の伸展が見られた。以上から本分子は再生繊維の伸長に関与することが明らかになった。またTG阻害剤を眼窩内に注射し、WGA-HRPをトレーサーとして視蓋での視神経再生繊維を追跡したところ、再生繊維の視蓋への到達がTG阻害剤添加群で抑制された。

次に視蓋での視神経再生、特にシナプス再形成期に発現が増加するクローンをスクリーニングし、数個のクローンを得た。興味深いことにこれらの分子は視神経切断50-80日にピークを示し、キンギョの再生視神経によるシナプス形成期と一致しており、今後その構造、局在、機能について研究を進める。また、魚の視神経再生を行動評価するシステムとしてコンピューター画像処理装置を開発し、特に追尾率 (2匹の魚が互いに追尾する行動の割合) という視覚再生の定量的解析法を開発し、特許出願した。

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：

氏名	所属	役職	担当する研究項目
野田昌晴	基礎生物学研究所	教授	研究総括
新谷隆史	同上	助手	領域特異的遺伝子の機能解析

氏名	所属	役職	担当する研究項目
作田拓	同上	同上	Ventropin結合蛋白の同定
鈴木亮子	同上	学振研究員	Retinaldehyde合成酵素の同定
藤川顕寛	同上	CREST研究員	PTPaseの機能解析
加藤彰	同上	同上	新規Igファミリー分子の機能解析
深田斉秀	同上	非常勤研究員	PTPaseの基質分子の解析
溝口正枝	同上	CREST研究補助員	マウスの遺伝子解析等
後藤恵	同上	同上	遺伝子導入・発現解析等
松井深恵	同上	同上	In situ hybridization等
渡我部育子	同上	特別協力研究員	PTPaseの役割
田村洋	同上	総合研究大学院大学 大学院生	KOマウスの解析
檜山武史	同上	同上 (H14.11より助手)	KOマウスの解析
大河原剛	同上	同上	新規転写調節因子の役割
高橋弘雄	同上	同上	領域特異化分子間の関係解析
鳥海滋	同上	同上	新規発現ベクター系の開発
井原賢	同上	同上	領域特異的分子の細胞レベルにおける解析

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：

氏名	所属	役職	担当する研究項目
野田昌晴	基礎生物学研究所	教授	研究総括
渡辺英治	同上	助教授	KOマウスの作成
新谷隆史	同上	助手	TGaseの機能、DNAチップ解析
中村隆弘	同上	科研費研究員 (H14.10よりCREST研究員)	キングヨcDNAライブラリーの構築
山田薫	同上	CREST研究補助員	SPFマウスの管理等
竹内靖	同上	文科技官	TGマウスの作成
加藤聖	金沢大学大学院	教授	再生期発現遺伝子の解析
菅原清	同上	講師	再生視神経の解剖学的解析
松川通	同上	助手	再生期発現変動遺伝子の単離
杉谷加代	同上	同上	組織の単離と遺伝子発現解析

氏名	所属	役職	担当する研究項目
郡山恵樹	同上	CREST研究補助員	組織切片の作成
田中聖之	同上	大学院生	Na, K-ATPaseの機能解析
中川貴志	同上	同上	キンギョの行動解析
劉中武	同上	研究員	再生期発現遺伝子の機能解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文発表

（海外）

- Hiyama, T.Y., Watanabe, E., Ono, K., Inenaga, K., Tamkun, M.M., Yoshida, S., & Noda, M.
Na_x channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nature Neurosci.* **5**, 511-512, 2002.
- Watanabe, E., Hiyama, T.Y., Kodama, R. & Noda, M.
Na_x sodium channel is expressed in non-myelinating Schwann cells and alveolar type II cells in mice. *Neurosci. Lett.* **330**, 109-113, 2002.
- Sugitani, K., Devadas, M., Sugawara, K., Matsukawa, T., Liu, Z.W., Ihita, S., & Kato, S.
The goldfish visual system as a useful model for CNS regeneration: From gene to behaviour. *Recent Res. Devel. Neurochem.* **5**, 375-383, 2002.
- Fujikawa, A., Shirasaka, D., Yamamoto, S., Ota, H., Yahiro, K., Fukada, M., Shintani, T., Wada, A., Aoyama, N., Hirayama, T., Fukamachi, H. & Noda, M.
Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nature Genetics* **33**, 375-381, 2003.
- Sakaguchi, N., Muramatsu, H., Ichihara-Tanaka, K., Maeda, N., Noda, M., Yamamoto, T., Michikawa, M., Ikematsu, S., Sakuma, S. & Muramatsu, T.
Receptor-type protein tyrosine phosphatase ζ as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons. *Neurosci. Res.* **45**, 219-224, 2003.
- Asahi, M., Tanaka, Y., Izumi, T., Ito, Y., Naiki, H., Kersulyte, D., Tsujikawa, K., Saito, M., Sada, K., Yanagai, S., Fujikawa, A., Noda, M. & Itokawa, Y.
Helicobacter pylori CagA containing ITAM-like sequences localized to lipid rafts negatively regulates VacA-induced signaling *in vivo*. *Helicobacter* **8**, 1-14, 2003.

- Tanaka, M., Maeda, N., Noda, M. & Marunouchi, T.
A chondroitin sulfate proteoglycan PTP ζ /RPTP β regulates the morphogenesis of Purkinje cell dendrites in the developing cerebellum. *J. Neurosci.* **23**, 2804-2814, 2003.
- Watanabe, U., Shimura, T., Sako, N., Kitagawa, J., Shingai, T., Watanabe, E., Noda, M. & Yamamoto, T.
A comparison of voluntary salt-intake behavior in Na_x-gene deficient and wild-type mice with reference to peripheral taste inputs. *Brain Res.* **967**, 247-256, 2003.

(2) 特許出願

1 件