

「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分子を同定している。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、切断後両生物種間で最初に発現が異な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、ニワトリ網膜において同定された領域特異的発現分子について継続して解析を進めた。まず53の全分子について詳細な遺伝子発現解析を行った。その結果、網膜の前後軸及び背腹軸の両方向に二重勾配を示す新しい分子群を同定することができた。一方、先に二重勾配分子であることを明らかにしたVentroptinについては、継続して詳細な機能解析を進めている。Ventroptinは、発生初期においてはBMP-4に対して、また発生後期においてはBMP-2に対して拮抗的に働くことにより、網膜の領域特異化に機能していると考えられる。これら三者の網膜の領域特異化における他分子に対する詳細な統御関係を明らかにするため、ニワトリにおいて遺伝子発現を抑制する系、及び、遺伝子発現を時期特異的に誘導する系の確立を行った。また、他の領域特異的に発現する分子についても個体レベルでの機能解析を中心に研究を進めている。特に、新規免疫グロブリン様分子については、ニワトリにおける発現抑制系を確立すると同時に、ノックアウトマウスの作成にも成功した。

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に、視神経切断前後の網膜及び神経組織についてcDNAライブラリーを調製し、シークエンス解析を進めた。その結果、計7万クローンについて塩基配列の決定が完了した。また、マウス網膜については、市販及びカスタム合成したマイクロアレイを用いることにより、視神経切断により発現量に変化する遺伝子群を明らかにすることが

できた。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ていたが、本年度は、融合タンパクを合成して、その視神経伸長活性を調べることにより、それぞれの分子の機能について検討した。また再生後期に視蓋において発現が増大する分子クローンを見出した。

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解析する。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) 視神経投射における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たとき、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。更に、いくつかの注目分子については遺伝子ノックアウトマウスの作成・解析を進める。本年度の成果・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 RLCS法により単離した53分子の総合的解析

RLCS法により単離した53の全分子について、ノーザンブロット法とin situ hybridization (ISH) 法による遺伝子発現解析を行った。その結果、これらの分子の発現様式は多様であり、それぞれ非常に個性的であることが明らかになった。また、多くの分子が発生の早期より発現しており、網膜における領域特異性の決定や維持に機能することが示唆された。さらに、Ventricularin以外に3個の分子の発現が、発生8日目の網膜において前後軸及び背腹軸の両方向に二重勾配を示すことが明らかになった。

② VentroptinとTGF-βファミリー分子の相互作用による領域特異化機構の解明

Ventricularinは発生初期には背腹軸方向においてBMP-4に拮抗するが、発生後期においては二重勾配をなしてBMP-2に拮抗し、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。これら2つのTGF-βファミリー分子は発現時期、発現領域は異なるものの、その生理活性としてはほとんど同じである。したがって、従来から用いてきた発生初期から恒常的に遺伝子を発現させる異所的発現系では、両者の機能を区別することができない。この問題を解決するため、レトロウイルスベクターを用いたsiRNAによる特異的遺伝子発現抑制系および薬剤による時期特異的遺伝子発現誘導系の開発を行った。その結果、ニワトリ胚網膜においてBMP-2の発現を特異的に長期間抑制したり、

VentropinやBMP-2が二重勾配をもって発現する発生後期においてBMP-2の異所的発現を誘導したりすることが可能となった。現在、これらの実験系を用いて、各種の領域特異的分子の発現と視神経投射に対するBMP-2の役割を解析中である。

③ 新規bHLH型転写因子の解析

RLCSにより単離した分子群の中に、新規のbHLH型転写因子を見出した。詳細なin situ hybridizationによる解析の結果、本分子は網膜の双極細胞と一部のアマクリン細胞に発現することが明らかになり、NeuroAB（Aはアマクリンを、Bは双極細胞を表わす）と命名した。NeuroABが発現するアマクリン細胞はGABA作動性アマクリン細胞へと成熟することから、NeuroABは双極細胞とGABA作動性アマクリン細胞の成熟に機能することが示唆された。さらにin vitroにおける解析の結果、NeuroABはリプレッサーとして機能し、またその転写制御活性は、セリン/スレオニンキナーゼであるGSK-3 β によって調節を受けることが示された。

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（RPTP）であるCRYP-2、並びに、網膜において領域特異的に発現するpleiotrophinをリガンドとするRPTPであるPtpzrについて解析を行っている。CRYP-2については、基質の候補分子として、ある種の受容体型チロシンキナーゼ（RTK）を同定している。培養細胞にこれらのRTKを強制発現させると、細胞内タンパクの著しいチロシンリン酸化レベルの亢進が観察されるが、CRYP-2が共存すると、このリン酸化の亢進が抑えられた。さらに、CRYP-2の細胞内領域のリコンビナントタンパクによって、これらのRTKがin vitroにおいて特異的に脱リン酸化されることを確認した。

Ptpzr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Ptpzrの発現と機能を解析することによって、Ptpzrのシグナル伝達機構を明らかにしつつある。本年度はPtpzr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Ptpzr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、Ptpzr遺伝子欠損マウスを用いた研究により、Ptpzr^{-/-}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、Ptpzrに対する外因性リガンド分子としてPtpzrに結合し、Ptpzrを不活化する。培養細胞を用いた実験により、VacAによってGit1を始めとするPtpzrの細胞内基質分子のチロシンリン酸化レベルが上昇し、その結果、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。また、VacA毒素はヒト胃癌由来細胞株において、MAPキナーゼファミリーに属するp38及びERK1/2を活性化させることを明らかにした。中枢神経機能に関しては、Ptpzr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Ptpzr遺伝子欠損マウスにお

ける線条体のドーパミン取り込み活性を中心に検討している。また、Yeast substrate-trapping systemを開発することによって得られたPtporzの基質候補分子（既に報告したGit1を含む）を分類した結果、チロシンリン酸化に依存して結合性を示す基質候補分子とPDZドメインを持つ恒常的結合分子、の大きく2種類に分類できることが判明した。さらに、これら基質候補分子は、リコンビナントPtporzによって、*in vitro*において特異的に脱リン酸化されることが確認された。

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。本分子については、ニワトリ及びマウスにおいて個体レベルの機能解析を進めている。まずニワトリにおいて、レトロウイルスベクターを利用してsiRNAを網膜に発現させることにより、本分子の発現を抑制する系を確立した。現在、この発現抑制による視神経投射への影響を解析中であり、興味深い結果が得られつつある。

一方マウスにおける機能解析のために、ノックアウトマウスの作成を進めた。昨年度に作成したキメラマウスを野生型マウスと交配し、ヘテロマウスを得た。これらヘテロマウス同士を交配し、得られたノックアウトマウスにおいて、本分子の発現が欠損していることを確認した。またノックインした蛍光タンパクのGFPが発現することも確認できた。ヘテロマウスにおけるGFPの発現を解析することにより、本分子の詳細な発現領域を明らかにすることができる。解析の結果、GFPの発現は背側の網膜神経節細胞だけでなく、脳内の限局した領域の神経細胞に特異的に発現することが明らかになった。このことから、本分子は網膜神経節細胞だけでなく、他の領域の神経細胞においても働いていることが示唆された。現在、作成したノックアウトマウスについて、視神経の投射を中心に解析を進めている。

③ マウスにおける新しい*in vivo*発現系の確立

最近レンチウイルスを用いることにより、高い効率でトランスジェニックマウスを作成できることが報告された。この系を用いると、核内へのDNA注入による通常のトランスジェニックマウスの作成と異なり、マウスのライン化のステップが省略できるため、多数の分子の機能解析を効率的に進めることができる。そこで本年度はこの系の立ち上げを行った。培養細胞を用いてCAGプロモーター支配下にGFPを発現するレンチウイルスを作製した。このウイルスをマウス受精卵に感染させた後、仮腹マウスの子宮内に移植し発生させたところ、移植した約半数の仔マウスにGFP遺伝子が導入されていることが確認された。また、これらのトランスジェニックマウスにおいては、GFPによる蛍光が全身で観察された。このように、レンチウイルスによるトランスジェニックマウスの作成系が確立できたと考えられる。

視神経再生グループ

哺乳類や鳥類においては、視神経が切断を受け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長し、トポグラフィックな正常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網羅的に比較解析することにより、再生の初期に機能する鍵となる分子の同定を目指している。

キンギョについては、市販のマイクロアレイは無く、公的データベースにおける塩基配列の登録数も極めて少ないため、まず塩基配列の解析より開始している。キンギョの視神経切断前後の網膜、視蓋等についてcDNAライブラリーを作製し、各クローンについてシーケンシングを行った。これまでに合計約7万クローンについて塩基配列の決定が終了している。現在、得られた配列データについて、クラスタリングを行うとともにアノテーションの付加を行い、データベースを構築している。

マウスについては、市販のオリゴマイクロアレイとカスタム合成を行ったマイクロアレイを用いて、総クローン数6万の遺伝子について視神経切断前後の網膜における遺伝子発現の変化を経時的に解析した。その結果、視神経切断後数時間のうちに多数の遺伝子の発現が変化することが明らかになった。また、このうちの約1/3の遺伝子については、12時間以内に遺伝子発現が元のレベルまで戻る、一過性の発現変化を示すことも明らかになった。これらの解析結果を、今後キンギョで行うマイクロアレイの解析結果と比較することにより、再生において重要な機能遺伝子の同定を目指す。

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、再生繊維の伸長期、視蓋への到達期、視蓋シナプス再形成期に区分し、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。

金魚の視神経切断5日目の網膜からcDNAライブラリーを作製し、正常及び切断5日目網膜からmRNAを抽出、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーションを実施した。5日目網膜で特異的にmRNAの発現が増加しているクローンを選択し、塩基配列を決定した。その結果、再生初期に増加する分子としてレチノール結合蛋白 (RBP)、トランスグルタミナーゼ (TG) 分子を同定した。ISH法により網膜での局在はRBPは視細胞、TGは神経節細胞であることが明らかになった。またノーザン法により、RBPのmRNA量は、視神経切断2-5日に一過性に増え10日で正常に復した。またTG mRNAは5-10日から増加し始め、20日でピークとなり、その後ゆっくりと正常に復した。その機能解析には、大腸菌やHEC293細胞で産生させたリコンビナント融合タンパクを精製して用いた。培養網膜組織片において、RBPは、レチノールと共存下に特異的に神経突起の伸展を促進した。またTGは単独で有意に神経突起の伸展を促進した。またRBP、TGの抗体の添加では、いずれも突起伸展が抑制された。このように両分子は、いずれも視神経線維の再伸長に重要な役割を果たしている分子であることが明らかになった。また、合成siRNAを培養下に細

胞内に導入したところ、有意に突起伸展が抑制された。また、神経細胞の生存・細胞死の観点から検討したところ、金魚の網膜では生存シグナルPI3K-Akt系が活性化されること、ラットではアポトーシス関連のBax、カスパーゼ系が増加することを見出した。

また、視神経切断60日後の視蓋からcDNAライブラリーを作製し、視神経切断により視蓋で発現が増加する分子をクローニングした。その結果、視蓋で増加するクローンを3個見出した。うち1個は鉄貯蔵蛋白フェリチン相同遺伝子であった。ISH法により視蓋の各層にポジティブ細胞が散在していることが観察された。そのmRNA量は正常では殆ど検出されず、その後ゆっくりと増加し、視神経切断60日目ピークであった。この発現時期から、視蓋でのシナプス再編成に何らかの役割を果たしていると思われる。更に、既知分子エフリンとセマフォリンのクローニングを行い、視神経のシナプス再編成におけるこれら退縮分子の役割についても検討しているところである。

一方、魚の視神経再生の行動学的評価法としてコンピューター画像処理装置を開発した。この装置は稚魚から成魚まで撮影可能であり、また1つの水槽に入れた2匹の魚を同時に、軌跡、相互作用（追尾行動）などを計測できるという利点をもっている。

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：網膜における領域特異化の分子機構、領域特異的神経結合形成の分子機構

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
作田 拓	同上	助手	Venroptin結合蛋白の同定
新谷隆史	同上	同上	領域特異的遺伝子の機能解析
檜山武史	同上	同上	KOマウスの解析
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	研究員	PTPaseの機能解析
加藤 彰	同上	研究員	新規Igファミリー分子の機能解析
山本泰憲	同上	研究員	同上
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	補助員	動物実験補助、生化学的実験補助
後藤 恵	同上	補助員	塩基配列解析等
松井深恵	同上	補助員	In situ hybridization等
綾部夕子	同上	補助員	同上
田村 洋	同上	総研大大学院生	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	新規特異化分子間の関係解析

鳥海 滋	同上	同上	新規CRMP分子の解析
井原 賢	同上	同上	新規特異的分子の細胞レベルにおける解析
米原圭祐	同上	同上	新規Igファミリー分子遺伝子改変マウスの解析
榎谷和真	同上	同上	新規CRMP分子の解析
清水秀忠	同上	同上	KOマウスの解析

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：マイクロアレイ法による再生関連遺伝子の同定、ディファレンシャルスクリーニング法による再生関連遺伝子の同定

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	Tgaseの機能、DNAチップ解析
中村隆弘	同上	研究員	キンギョcDNAライブラリーの構築
高雄元晴	同上	学振研究員	視神経切断マウスの作成と解析
山田 薫	同上	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
田中瑠美	同上	総研大大学院生	TGaseの機能
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
荒井國三	同上	講師	再生分子の機能解析
杉谷加代	同上	助手	組織の単離と遺伝子発現解析
本間啓子	同上	同上	再生分子の発現解析
劉 中武	同上	研究員	再生期発現遺伝子の機能解析
郡山恵樹	同上	技術員	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

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Yuasa-Kawada, J., Suzuki, R., Kano, F., Ohkawara, T., Murata, M. & Noda, M. (2003) Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization. **Eur. J. Neurosci.** 17, 2329-2343.
- Takahashi, H., Shintani, T., Sakuta, H. & Noda, M. (2003) CBF1 controls the retinotectal topographical map along the anteroposterior axis through

multiple mechanisms. **Development** 130, 5203-5215.

- Kato, S., Nakagawa, T., Ohakawa, M., Muramoto, K., Oyama, O., Watanabe, A., Nakashima, H., Nemoto, T., Sugitani, K. (2004) A computer image processing system for quantification of zebrafish behavior. **J. Neurosci. Methods** 134, 1-7.
- Nakayama, M., Kimura, M., Wada, A., Yahiro, K., Ogushi, K., Niidome, T., Fujikawa, A., Shirasaka, D., Aoyama, N., Kurazono, H., Noda, M., Moss, J. & Hirayama, T. (2004) *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. **J. Biol. Chem.** 279, 7024-7028.
- Ohyama, K., Ikeda, E., Kawamura, K., Maeda, N. & Noda, M. (2004) Receptor-like protein tyrosine phosphatase ζ /RPTP β is expressed on tangentially aligned neurons in early mouse neocortex. **Develop. Brain Res.** 148, 121-127.
- Shintani, T., Kato, A., Yuasa-Kawada, J., Sakuta, H., Takahashi, M., Suzuki, R., Ohkawara, T., Takahashi, H. & Noda, M. (2004) Large-scale identification and characterization of genes with asymmetric expression patterns in the developing chick retina. **J. Neurobiol.** 59, 34-47.
- Matsukawa, T., Arai, K., Koriyama, Y., Liu, Z. & Kato, S. (2004) Axonal regeneration of fish optic nerve after injury. **Biol. Pharm. Bull.** 27, 445-451.

(2) 特許出願

H15年度特許出願：なし (CREST研究期間累積件数：1件)