

「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

(自然科学研究機構 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り、両者は一体化して扱うべき研究課題である。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異なる発現を示すマスター遺伝子の同定とその機能の解明を目指す。

本年度も、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。網膜における領域特異化の分子機構については、領域特異的に発現する分子群について、上下関係を明らかにする研究を進めている。特に、VentropinとBMPファミリー分子を中心に解析を進めた結果、領域特異化の分子機構の全容を明らかにしつつある。一方、領域特異的結合形成の分子機構については、軸索ガイダンスやシナプス形成等に重要な役割を果たしていることが判明している受容体型チロシンキナーゼであるEphの活性を、負に制御する受容体型チロシンホスファターゼを同定した。さらに、新規免疫グロブリンスーパーファミリー分子、およびleucine-rich repeatを有する新規分子の解析を進めた結果、これらの分子が、これまで詳しい分子メカニズムが不明であった軸索の分枝形成、あるいはリファインメントに関与することが明らかになってきた。

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、クラスタリング、アノテーションの付加を行い、データベースを構築した。このデータベースの情報を基にしてキンギョDNAマイクロアレイを作製した。一方、マウスについては市販のDNAマイクロアレイを用いて、視神経切断前後で発現が変化する遺伝子群を経時的に解析した。これらの遺伝子群についてクラスタリング解析を行い、発現変化のパターンにより分類を行った。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、これら遺伝子の再生における役割を明らかにするため分子生物学、細胞生物学、行動学など総合的な見地から検討を加えた。また、魚（キンギョ、ゼブラフィッシュ等）の視神経再生状態を評価するための行動解析装置を開発している。

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解析している。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、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

①CBF-1とCBF-2による前後軸方向の領域特異化

winged-helix型の転写因子chick brain factor-1 (CBF-1) および -2 (CBF-2) は、ニワトリ網膜において、それぞれ鼻側、耳側で領域特異的発現を示す。CBF-1の網膜耳側における異所的発現によりCBF-2の発現は抑制され、逆にCBF-2の網膜鼻側における異所的発現によりCBF-1の発現は抑制された。さらに、CBF-1の異所的発現により、網膜鼻側で特異的発現を示すSOHo-1、GH6およびephrin-A2、ephrin-A5については発現領域の拡大が見られ、網膜耳側で特異的発現を示すEphA3の発現は抑制された。逆に、CBF-2の異所的発現により、SOHo-1、GH6およびephrin-A5の発現は抑制され、EphA3については発現領域の拡大が見られた。CBF-1, CBF-2はこのように網膜の前後軸方向の網膜領域特異化の遺伝子カスケードのトップにあって、網膜の前後軸を決めていると考えられる。現在CBF-2の機能的役割について詳細に解析している。

②VentroptinとBMPファミリー分子による領域特異化

前年度までの研究により、Ventroptin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、従来前後軸方向に発現量の差がある分子とされてきたephrin-A2の領域特異的な発現を二重勾配的に制御していることが明らかになった。今年度は、RNAiを用いた特異的遺伝子発現抑制系や薬剤による時期特異的発現誘導系の開発を行い、発生後期の網膜においてBMP-2の発現レベルを変化させて、その影響を検討した。その結果、従来背腹軸方向に発現量が差のあるとされている

全ての分子の発現が影響を受けることが明らかになった。そこでこれらのトポグラフィック分子の発現パターンの見直しを行ったところ、BMP-2の発現レベルの変化によって発現パターンに影響が見られた上記のすべての分子が、二重勾配を持って発現していることが判明した。この知見を指示するように、例えばTbx5を異所的に発現させた時にも、VentroptinによるBMP-2の発現抑制時と同様に、両軸方向に同時に投射パターンが変化した。

これまで移植実験等の結果から、背腹軸方向における網膜内の領域特異性はstage 13/14 (E2) 頃までに決定し、その後不可逆であるとされていたが、以上の結果はstage 13/14以降も網膜神経節細胞は可塑性を有しており、BMP-2の発現が領域特異的な網膜視蓋投射に不可欠であることを示している。また、前後軸・背腹軸方向における投射は、従来、独立に制御されていると考えられてきた。しかしながら、CBF-1がBMP-2の発現を抑制することによってDV軸の回転を引き起こし、従来の直交する2軸に対しては二重勾配化するため、視蓋における両軸方向の投射は協調的に進むことになると考えられる。

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CRYP-2

網膜の耳側で高く鼻側で低い発現を示す、受容体型プロテインチロシンホスファターゼのCRYP-2について解析を行っている。CRYP-2は、8つのタイプⅢフィブロネクチン様リピートを有する細胞外領域、膜貫通ドメイン、そして1つのプロテインチロシンホスファターゼ(PTP)ドメインより成る細胞内領域から構成されている。CRYP-2の基質分子について探索した結果、EphAおよびEphBを非常に良い基質とすることが明らかになった。また、Ephによって誘導される細胞の形態変化がCRYP-2によりほぼ完全に抑制されることから、CRYP-2はEphの活性化に重要な役割を果たしているチロシン残基を基質サイトとしていることが推測された。そこで、CRYP-2による脱リン酸化サイトを探索したところ、Ephの活性化においてトリガーとしての役割を果たしている膜近傍に位置するチロシン残基を基質サイトとすることが判明した。

②受容体型プロテインチロシンホスファターゼPtporz

Ptporz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Ptporzの発現と機能を解析することによって、Ptporzのシグナル伝達機構を明らかにしつつある。Ptporz遺伝子より発現する分子種を詳細に検討した結果、従来知られていた3種のアイソフォーム以外に、複数の新規アイソフォームの存在を確認した。胎生14日目から19ヶ月齢までのマウス網膜では、視覚系の成熟に必須の生理的イベントである開眼の時期にPtporz-Sが多く発現していること、成熟するに従い、網膜で発現するPtporzのほとんどが、新規に見いだされた一つのアイソフォームになるという興味深い知見を得た。成熟Ptporz欠損マウスの網膜に目立った組織学的変化は認められないが、自発運動活動の概日リズムを解析したところ、暗期前半部においてのみ活動量が低下することを見いだした。今後、開眼時期の視神経の発達についても検討予定である。

ところで多くのRPTPについては、基質分子が同定されておらず、その活性制御機構もよ

く判っていない。我々は、これを打破するために、原理上すべてのPTPに応用可能なPTPの基質分子探索法、Yeast substrate-trapping systemを開発した。酵母のtwo-hybrid法を応用した本法は、PTPと基質分子の相互作用をPTPの触媒活性依存的に検出するものである。本法を用いてPtprzの基質分子のスクリーニングを行った結果、Git1、p190RhoGAP、PIST、MAGI-1が基質になることを明らかにした。

次に、Ptprz欠損マウスの脳海馬における可塑性について解析したところ、野生型マウスとの間に、週齢依存的な相違が観察された。すなわち、12週齢以下の若い成熟マウスにおいては野生型マウスとの間に違いが認められないが、13週齢以降になると、Ptprz遺伝子欠損マウス海馬CA1領域での長期増強(LTP)レベルの有意な亢進が観察された。また同時に、高週齢マウスにおいて空間学習能力が低下していることが判明した。Ptprz欠損マウスにおいて亢進が見られたLTPは、Rho結合性キナーゼ(ROCK)の阻害剤によって野生型のレベルに戻ることから、Ptprz欠損マウスにおいては、器質的変化ではなくシナプス可塑性の機能的変化が想定される。

海馬機能以外では、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しており、ドーパミン神経系の機能変化が予想された。実際、メタンフェタミン投与後のPtprz遺伝子欠損マウスの線条体のドーパミン取り込み活性が低下することが明らかになった。今後、これに関わる分子の機能調節にPtprzが関与しているのか検討する。

③新規免疫グロブリンスーパーファミリー分子

免疫グロブリンドメインを2個有する新規分泌性分子が、網膜背側側に領域特異的に発現することを見出している。特異的抗体を用いた免疫染色から、本分子は軸索を輸送され、成長円錐まで運ばれることが示唆される。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。

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。網膜視蓋投射が完成している時期(E18)において、背側由来の視神経投射を解析したところ、この分子の発現抑制により、本来視蓋の一カ所においてコンパクトに形成されるはずの神経投射のterminal zoneが、広い領域に分散したままの状態であることが明らかになった。通常の投射形成においては、視蓋に到達した視神経軸索は、当初視蓋上に多少乍ら分散した状態で分布する。しかしその後、軸索からの分枝形成、シナプス形成、およびそれに続く不適切な分枝やシナプスの除去の過程を経ることにより、コンパクトなterminal zoneが発達・形成されるという経過をたどる。本分子の発現を抑制した場合には、分枝形成期以降に異常が見られるため、本分子が、これまで詳しい分子メカニズムが不明であった軸索の分枝形成等に関与することが明らかになってきた。

④Leucine-rich repeat (LRR) 構造を有する新規分子

LRR構造と免疫グロブリンドメインより成る細胞外領域、膜貫通ドメイン、および約60アミノ酸から成る細胞内領域を有する新規分子が発生初期より網膜腹側で発現することを

見出している。本分子の機能を明らかにするために、ニワトリ網膜全体に強制発現を行ったところ、E18の投射が完成した時期において、網膜背側からの視神経の走行が視蓋内で大きく乱れているのが観察された。網膜内および視蓋に侵入するまでの経路については大きな異常が認められなかった。この投射異常について、発生を追って詳細に解析したところ、視蓋において、視神経と視蓋の神経細胞との間にシナプスが形成される時期以降（E14以降）に異常が認められたことから、本分子が、不適切な分枝やシナプスの除去など、リファインメントの過程に関与することが推測された。現在、RNAiを用いて、本分子の発現抑制を行った場合の影響について解析を行っている。

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、再生の初期の運命決定に機能する鍵となる分子の同定を目指している。

①マウス視神経切断時の遺伝子変化の解析

市販の22KオリゴDNAアレイ、および公的データベースの情報を利用して我々が独自に作製した44KのオリゴDNAアレイを用いて、視神経切断後経時的に遺伝子発現変化を解析した。その結果、視神経切断後1時間の時点で、100以上の遺伝子の発現が変化していることが明らかになってきた。得られたのデータについてクラスタリング解析を行ったところ、発現変化を示す遺伝子群を発現変化のパターンにより12のグループに分類できた。

②キンギョ視神経切断時の遺伝子変化の解析

視神経切断前後の網膜、視蓋等より調製した約7万クローンのcDNAについて、塩基配列の決定、クラスタリングおよびアノテーションの付加を行い、データベースを構築した。この情報を基にして、42KのオリゴDNAアレイを完成させた。このオリゴDNAアレイを用いて、視神経切断後経時的に遺伝子発現変化を解析した。現在、得られたデータについてクラスタリング解析を行っている。

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、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を目的とする。

①プルプリンの役割

プルプリンmRNAレベルは、視細胞において損傷2～5日に上昇し、10日にはコントロールに復することがわかった。本分子は、アミノ酸配列より分泌型レチノール結合タンパク質であることが推測された。更にペプチド抗体を作製し免疫染色を行ったところ、視神経損

傷5日後に網膜全層に亘りプルプリンの染色像が得られた。次いでリコンビナントタンパク質を作製し、正常網膜片培養に添加すると、レチノールとの共存下でのみ有意な神経突起伸張が誘発された。またレチノイン酸単独でも同等の効果が見られた。このことよりプルプリンは、転写調節因子であるレチノイン酸の合成を網膜内で促進することにより、神経再生のトリガーとなっている可能性が示唆された。

②トランスグルタミナーゼの役割

トランスグルタミナーゼmRNAは、視神経損傷10～30日に亘り、神経節細胞でのみ発現が増加し、40～50日にはコントロールレベルに復することが判明した。更にリコンビナントタンパク質を視神経切断5～7日目の網膜片培養に添加したところ、太くて長い神経突起の伸展が観察された。次いでトランスグルタミナーゼ遺伝子に特異的なsiRNAを導入し、mRNAレベルを半減させたところ、神経突起の伸展が抑えられた。このことより、トランスグルタミナーゼは細胞表面においてタンパク質架橋反応により神経突起の伸展を促進していることが示唆された。また、ラット網膜片培養下にリコンビナントタンパク質を添加しても神経突起の伸展が有意に促進されたことから、哺乳類の神経再生にもトランスグルタミナーゼが有効であることが明らかとなった。

③小型魚類用行動解析装置の開発

ゼブラフィッシュはキンギョと比べて遊泳速度も速く、かつ体色も大きく異なっている。そこで、従来の10フレーム/秒より30フレーム/秒という高速でコマ撮りが行なえるソフトウェアを開発し、かつCCDカメラを2台設置し、3次元画像として魚の遊泳を捉えることに成功した。また、対象魚類個体数も3～4匹まで同時に別々に取り込むことができる画像処理システムを開発した。本装置は成魚のみならず、ふ化直後の稚魚の動きも正確に捉えることが可能である。本装置を用いて視覚依存性行動の視神経損傷前後の変化を計測することにより、神経再生の評価を行動の面から行っている。

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及び領域特異的神経結合形成の分子機構

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：視神経再生の分子機構の解明

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

- Ohkawara, T., Shintani, S., Saegusa, C., Yuasa-Kawada, J., Takahashi, M.

and Noda, M. (2004) A novel basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptional repressor, NeuroAB, expressed in bipolar and amacrine cells in the chick retina. **Mol. Brain Res.** 128, 58-74.

- Muramatsu, H., Zou, P., Suzuki, H., Oda, Y., Chen, G-Y., Sakaguchi, N., Sakuma, S., Maeda, N., Noda, M. and Muramatsu, T. (2004) $\alpha_4\beta_1$ - and $\alpha_6\beta_1$ -integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. **J. Cell Sci.** 117, 5405-5415.
- Hiyama, T.Y., Watanabe, E., Okado, H. and Noda, M. (2004) The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na_x sodium channels for the control of salt-intake behavior. **J. Neurosci.** 24, 9276-9281.
- Matsukawa, T., Sugitani, K., Mawatari, K., Koriyama, Y., Liu, Z.W., Tanaka, M. and Kato, S. (2004) Role of purpurin as retinol-binding protein in goldfish retina during the early stage of optic nerve regeneration: Its priming action on neurite outgrowth. **J. Neurosci.** 24, 8346-8353.
- Fukada, M., Kawachi, H., Fujikawa, A. and Noda, M. (2005) Yeast substrate-trapping system for isolating substrates of protein tyrosine phosphatases: Isolation of substrates for protein tyrosine phosphatase receptor type z. **Methods** 35, 54-63.
- Niisato, K., Fujikawa, A., Komai, S., Shintani, T., Watanabe, E., Sakaguchi, G., Katsuura, G., Manabe, T. and Noda, M. (2005) Aged-dependent enhancement of hippocampal long-term potentiation and impairment of spatial learning through the Rho-associated kinase pathway in protein tyrosine phosphatase receptor type Z-deficient mice. **J. Neurosci.** 25, 1081-1088.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：1件）