

岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所 教授

野田 昌晴

「神経ネットワーク形成の遺伝子プログラム」

## 1. 研究実施の概要

脊椎動物の中樞神経系は、1) 神経芽細胞の増殖・分化、2) 細胞移動、3) 神経軸索の伸長路決定、4) 標的部位の識別、5) シナプス結合の形成と維持、6) 細胞死、7) シナプス結合の可塑的变化といった一連の過程によって完成、維持される。また、完成した神経系が機能するためには多くの受容体やイオンチャンネル等の素子が重要な働きをしている。本研究ではこれらの分子機構を総合的に理解することを目指して3つのサブグループに分かれて取り組んだ。

「網膜視蓋投射グループ」では脳・神経系における領域特異的神経結合形成の分子機構を明らかにすることを目指した。脳神経系の発生過程において正確な神経回路網を形成することは、成長後の成体において高次の神経機能を発現する為に必須の構造的基盤となっている。中樞神経系では、ある神経細胞集団が軸索をのばして標的となる細胞集団に神経結合を作る時に、トポグラフィックな投射 (topographic projection) 様式がしばしば見られる。トポグラフィックな投射においては、ある神経細胞集団から発した軸索が互いの二次元的相対位置関係を保った形式で標的細胞集団とシナプスを形成する。あたかも個々の神経細胞は集団における自らの位置を知っているかのようである。このようなトポグラフィックな投射がどのようにして形成されるかを明らかにすることは、神経発生生物学上で非常に重要な課題である。トポグラフィックな投射の研究においては鳥類や両生類における網膜視蓋投射系が有用な系として用いられてきた。なかでもニワトリは、目が大きく視覚系が良く発達していること、さまざまな胚操作が比較的容易に行えるなどの理由から、格好のモデルシステムとなっている。この系では網膜内で鼻側由来の視神経は視蓋の後側に、耳側の視神経は視蓋の前側に投射する。また、背側視神経は視蓋の腹側に、腹側視神経は視蓋の背側に投射する。

我々は最初に網膜において領域特異的 (topographic) な発現をする分子群を網羅的に同定することから始め、引き続いてその分子機構を明らかにすることを目指して、RLCS 法を用いて大規模な探索を行った。発生上の時期としては視神経が視蓋上の標的部位を探索する E8 の網膜を用いた。約 2 万を超える cDNA をスクリーニングした結果、前後軸方向に 53 分子、背腹軸方向に 20 分子を同定した。これらの分子は分泌因子、転写調節因子、受容体分子、酵素、細胞内シグナル伝達分子、細胞骨格関連分子等に分類された。これらの分子は過半数が新規分子であったが、この中に、EphR、Ephrin 分子を始めとする既知の topographic 分子群も含まれており、この方法の有効性が証明された。また、E8 の網膜を用いて探索したにもかかわらず、眼の発生初期の E2 あたりを発現ピークとする分子も含まれており、予想外に広い時間軸をカバーする分子群が単離され、網膜の発生過程における前後・背腹の軸決定から領域特異化、そして領域特異的神経結合の形成に関わる一連の遺伝子カスケードを構成する分子群が同定されたと考えられる。新規分子の内、これまでに分子機能を明らかにした幾つかを紹介する。レチノイン酸は眼の形成に必須の物質であり、生体内ではビタミン A から生合成される。ビタミン A やレチノイン酸が欠乏すると眼の形

成不全が起こることが知られているが、それは特に眼の下半分（腹側）において顕著である。我々は網膜腹側で発現するレチノイン酸合成酵素（RALDH-3）を同定し、この遺伝子が眼の形成のマスター遺伝子である Pax6 の下流に位置することを明らかにした。また、網膜において唯一、前後・背腹両軸方向に対して勾配を持って発現する分子 Ventroptin を発見した（E2～E6 では腹（高）－背（低）の勾配を、E6 からは腹／前（高）－背／後（低）の勾配を示す）。本分子は BMP-4 の中和因子であり、かつ BMP-4 の発現を抑制する活性があることを明らかにした。異所的強制発現の結果、Ventroptin は BMP-4 と協調して網膜の背腹軸決定（E2）に関わった後、引き続いて E6 から起こる前後軸、背腹軸両方向における網膜視蓋投射を制御することが明らかになった。Ventroptin の存在は、これまで独立であると考えられてきた前後軸、背腹軸方向の投射制御が協調的に進む現象であることを示している。

「チロシンホスファターゼグループ」では脳・神経系に発現する受容体型 PTPase の内、R5 サブファミリーを構成する PTP $\zeta$  と PTP $\gamma$  を取り上げ、脳形成及び脳機能における役割を解明する研究を行った。この研究は脳の発達における細胞外マトリックス分子の重要性に着目し、脳個有の細胞外マトリックス分子であるプロテオグリカン（PG）の役割を明らかにすることに研究の端を発している。

我々は脳のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの中で最も分子量が大きく、発現量も多い分子である 6B4 PG の cDNA クローニングを行った。その結果、驚いたことに、これが PTP $\zeta$  の細胞外領域に相当するスプライシングアイソフォームの 1 つであることが判明した。その後 3 つの PTP $\zeta$  のアイソフォーム全てがコンドロイチン硫酸 PG であることが明らかになった。本研究では PTP $\zeta$  の役割を分子生物学的、生化学的手法を駆使して 1 つずつ明らかにしてきた。PTP $\zeta$  のリガンドとしてプレイオトロフィン、ミドカインを同定するとともに、これらが神経細胞の移動を誘導することを示した。また、PTP $\zeta$  の C 末に主にシナプス後膜に存在する PSD-95 ファミリー分子が第二 PDZ ドメインを介して結合することを明らかにした。更に Yeast substrate-trapping system を開発し、PTP $\zeta$  の基質として GIT-1 を同定した。また、PTP $\zeta$  ノックアウトマウスの解析から、海馬 LTP、ドーパミン神経系に異常があることが判明した。予想外の展開としては、PTP $\zeta$  が少量ながら胃の粘膜上皮細胞等にも発現していること、また H. pylori 菌の分泌する VacA 毒素が PTP $\zeta$  に結合することが明らかになった。加えて、PTP $\zeta$  ノックアウトマウスでは WT マウスと異なり、VacA 投与によって全く胃潰瘍を発症しないという知見を得た。これについては現在、論文を作成中である。

「遺伝子ノックアウトマウスグループ」では、主に、機能不明の Na<sub>x</sub> チャンネル（これまで NaG、Na<sub>v</sub>2 等と呼ばれていた）の機能を明らかにする研究を行った。Na チャンネルはこれまで 10 個の遺伝子が同定されているが、本チャンネル分子以外は電位依存性チャン

ネルであることが報告されている。この分子は cDNA 発現系を作った機能解析が成功しておらず、機能が不明のまま残された唯一の Na<sup>x</sup> チャンネルである。我々は世界に先駆けて Na<sub>x</sub> チャンネル遺伝子ノックアウトマウスを作成し、その表現型からその機能に迫るという戦略を取った。Na<sub>x</sub> ノックアウトマウスの解析から Na<sub>x</sub> が中枢の体液塩分濃度の感知に関わることを明らかにするとともに、Na<sub>x</sub> が Na イオン濃度の上昇を感知して開くイオンチャンネルであることを示した。また、このグループは脳内の種々の知覚情報処理回路を選択的に可視化したマウスを作成することに成功した。

## 2. 研究構想

脳の神経回路網は動物における情報の受容、認識、統合、記憶ひいては情動、行動の基盤であり、個体発生の過程で誤りなく形成されなければならない。すなわち、中枢神経系構築の基本的枠組みは遺伝情報に基づいていると考えられる。中枢神経系は、1) 神経芽細胞の産生、2) 細胞移動、3) 神経軸索の伸長、4) 標的部位の識別、5) シナプス結合の形成と維持、6) 細胞死、7) シナプス結合の再構築（可塑性）といった一連の過程を経て完成、維持される。これらの過程は多様な細胞-細胞間、細胞-細胞外基質間あるいは細胞-神経栄養（分化）因子間の相互作用によって制御されている。一方、中枢神経系には領域ごとに異なる役割分担があり、この領域特異性の分子的基盤も遺伝子発現の領域特異性にあると捉えることができる。

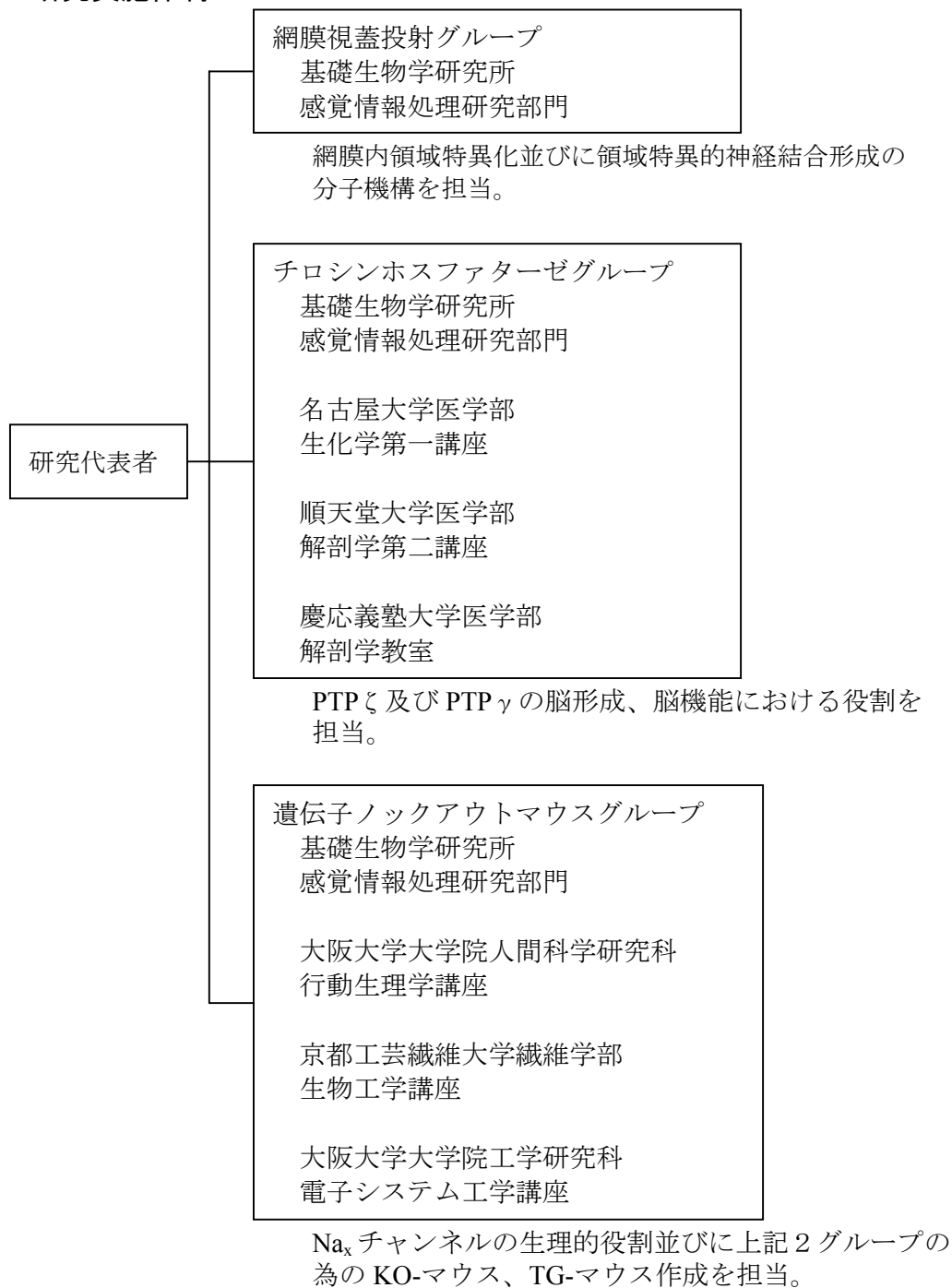
本研究では第1に中枢神経系の形成過程の中でも最も重要と考えられる神経結合の特異性について、ニワトリ網膜視蓋投射系を取り上げて研究を行う。領域特異的神経結合の形成を網膜における領域特異性形成の一面として捉え、その分子機構の解明を目指す。我々は既に網膜の前側（鼻側）あるいは後側（耳側）の領域に選択的に発現する分子を単離することを試み、Winged-helix 転写調節因子ファミリーに属する分子 CBF-1、CBF-2 を見出すと共に、この2つの分子が網膜視蓋投射における前後軸方向領域特異性を決定するマスター遺伝子であることを明らかにした。本研究では新しい方法に基づいて、網膜において前後軸、背腹軸方向で領域特異的な発現をする分子の系統的なスクリーニングを行い、網膜における領域特異化に関与する分子の全体像を明らかにするとともに、この系における領域特異的神経投射成立の分子機構を解き明かしたい。

脳の主要な細胞外マトリックス構成成分はプロテオグリカンである。タンパク質チロシンホスファターゼζ（PTPζ）はこれまでに同定された唯一のプロテオグリカン型 PTP であり、発生初期から成体に至るまで脳神経系に特異的に発現する。PTPζは PTPγと2つで受容体型 PTP のサブファミリー、R5 を形成している。本研究は第2に、中枢神経系に大量に発現する PTPζと PTPγの脳形成・脳機能における役割を解明する。最近、我々は、PTPζがヘパリン結合性細胞増殖因子プレイオトロフィン（pleiotrophin）をリガンドとすることを明らかにした。プレイオトロフィンにはミッドカイン（midkine）という良く似た一次構造を持つファミリー分子が存在しており、これと PTPζ、PTPγの関係を明らかに

することも急務である。PTP $\zeta$ の分子多様性、PTP $\zeta$ の細胞内基質分子の同定、遺伝子ノックアウトマウスの解析を通じて、PTPの果たす神経細胞の移動、分化、神経結合形成、シナプス伝達等における役割を解明したい。

完成された神経系が機能するためには神経細胞上の種々の受容体やイオンチャンネル等の素子が重要な働きをしている。Naイオンチャンネルには現在11個の異なる遺伝子が存在することが判っている。その内10分子について電位感受性のイオンチャンネルであることが判明しているが、1つだけ機能不明の遺伝子があり、Na $_x$  (Na $_v2$ )と呼ばれている。本研究では第3に本分子の機能を明らかにするとともに、その生理的役割を解明するため、遺伝子ノックアウトマウスを作成し、その解析を行う。

### 3. 研究実施体制



#### 4. ワークショップシンポジウム等の開催

・平成13年2月23日－24日

基生研研究会「網膜の発生・分化・再生」（岡崎コンファレンスセンター）

内容：網膜は中枢神経系の一部が突出してできたものであるが、構造が比較的簡単であること、イモリ等で再生画起こることから、昔からよく基礎研究の対象となってきた。一方、臨床においても網膜は再生可能な神経組織として最近注目されるようになってきた。しかしながら、今までこれらの網膜研究に携わる人々が一堂に介し、議論する機会はほとんどなかった。今回初めて網膜研究の最先端に行く基礎系と臨床系の研究者が集い、2日間にわたって研究成果を統合的に議論することができた。研究分野の細分化が進み、個人の研究者でカバーできる範囲が限られている近年、このような研究会によって互いの理解が深まることは非常に有意義であった。

参加者：約70名

・平成13年6月4日－5日

基生研研究会「細胞内シグナル伝達におけるプロテインホスファターゼ」

（岡崎コンファレンスセンター）

内容：タンパク質リン酸化による分子機能の制御は生命の発生、分化、再生、免疫、癌化、記憶、学習等多くの生命現象において普遍的に関わる事が明らかにされてきた。タンパク質のリン酸化は Ser/Thr-kinase と Tyr-kinase によって行われ、脱リン酸化は Ser/Thri-phosphatase と Tyr-phosphatase により担われる。それぞれ数百の遺伝子があると言われているが、両活性のバランスとして個々のタンパク分子のリン酸化レベルが決定される。研究会では、kinase に比較して明らかに研究が遅れている phosphatase に焦点を絞り、その研究の現状と問題点、また新しい方法論の開発についても議論が行われた。さらにプロテインホスファターゼの関わる生命現象の多様性を概観し生命現象と機能調節メカニズムの統合的理解への試みと21世紀における研究の方向性についても討論されるなど、小規模ながら大変意義のある研究会となった。

参加者：約20名

## 5. 主な研究成果

### (1) 論文発表

- 1) Shintani, T., Maeda, N., Nishiwaki, T. & Noda, M.: Characterization of rat receptor-like protein tyrosine phosphatase  $\gamma$  isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 230, 419-425 (1997)
- 2) Hamanaka, H., Maeda, N. & Noda, M.: Spatially and temporally regulated modification of the receptor-like protein tyrosine phosphatase  $\zeta/\beta$  isoforms with keratan sulfate in the developing chick brain. *Eur. J. Neurosci.*, 9, 2297-2308 (1997)
- 3) Noda, M., Yamagata, M., Yuasa, J. and Takahashi, M.: Topographic and laminar connection in the chick retinotectal system. *In* Molecular basis of axon growth and nerve pattern formation (H. Fujisawa, *ed.*) pp. 197-214. Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1997)
- 4) Nishiwaki, T., Maeda, N. & Noda, M.: Characterization and developmental regulation of proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase  $\zeta$ /RPTP  $\beta$  isoforms. *J. Biochem.*, 123, 458-467 (1998)
- 5) Shintani, T., Watanabe, E., Maeda, N. & Noda, M.: Neurons as well as astrocytes express proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase  $\zeta$ /RPTP  $\beta$ : analysis of mice in which the *PTP  $\zeta$ /RPTP  $\beta$*  gene was replaced with the *LacZ* gene. *Neurosci. Lett.*, 247, 135-138 (1998)
- 6) Yamagata, M. & Noda, M.: The winged-helix transcription factor CWH-3 is expressed in developing neural crest cells. *Neurosci. Lett.*, 249, 1-4 (1998)
- 7) Maeda, N. & Noda, M.: Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase  $\zeta$ /RPTP  $\beta$  and its ligand pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in neuronal migration. *J. Cell Biol.*, 142, 203-216 (1998)
- 8) Nishiwaki, T., Maeda, N. & Noda, M.: Characterization and developmental regulation of proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase  $\zeta$ /RPTP  $\beta$  isoforms. *In* Neural Development, Keio University Symposia for Life Science and Medicine, vol.2 (K. Uyemura, K. Kawamura & T. Yazaki, *eds.*) pp. 291-297. Springer-Verlag Tokyo (1999)
- 9) Takahashi, M., Yamagata, M. & Noda, M.: Specific expression of ezrin, a cytoskeletal-membrane linker protein, in a subset of chick retinotectal and sensory projections. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 545-558 (1999)
- 10) Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Kimura, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T. & Noda, M.: A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTP  $\zeta$ /RPTP  $\beta$  binds a heparin-binding growth factor midkine: Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTP  $\zeta$ . *J. Biol. Chem.*, 274, 12474-12479 (1999)
- 11) Revest, J.-M., Faivre-Sarrailh, C., Maeda, N., Noda, M., Schachner, M. & Rougon, G.: The interaction between F3 immunoglobulin domains and protein tyrosine phosphatase  $\zeta/\beta$  triggers bidirectional signalling between neurons and glial cells. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 1134-1147 (1999)
- 12) Kawachi, H., Tamura, H., Watakabe, I., Shintani, T., Maeda, N. & Noda, M.: Protein tyrosine phosphatase  $\zeta$ /RPTP  $\beta$  interacts with PSD-95/SAP90 family. *Mol. Brain Res.*, 72, 47-54 (1999)
- 13) Yamagata, M., Mai, A., Pollerberg, G.E. & Noda, M.: Regulatory interrelations among topographic molecules CBF1, CBF2 and EphA3 in the developing chick retina. *Dev. Growth*



- Differ., 41, 575-587 (1999)
- 14) Yamakawa, T., Kurosawa, N., Kadomatsu, K., Matsui, T., Itoh, K., Maeda, N., Noda, M. & Muramatsu, T.: Levels of expression of pleiotrophin and protein tyrosine phosphatase  $\zeta$  are decreased in human colorectal cancers. *Cancer Lett.*, 135, 91-96 (1999)
  - 15) Meng, K., Rodriguez-Peña, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M. & Deuel, T.F.: Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of  $\beta$ -catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase  $\beta/\zeta$ . *PNAS*, 97, 2603-2608 (2000)
  - 16) Watanabe, E., Fujikawa, A., Matsunaga, H., Yasoshima, Y., Sako, N., Yamamoto, T., Saegusa, C. & Noda, M.:  $\text{Na}_v2/\text{NaG}$  channel is involved in control of salt intake behavior in the central nervous system. *J. Neurosci.*, 20, 7743-7751 (2000)
  - 17) Fukada, M., Watakabe, I., Yuasa-Kawada, J., Kawachi, H., Kuroiwa, A., Matsuda, Y. & Noda, M.: Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family. *J. Biol. Chem.*, 275, 37957-37965 (2000)
  - 18) Suzuki, R., Shintani, T., Sakuta, H., Kato, A., Ohkawara, T., Osumi, N. and Noda, M.: Identification of RALDH-3, a novel retinaldehyde dehydrogenase, expressed in ventral region of the retina. *Mech. Develop.*, 98, 37-50 (2000)
  - 19) Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., Kallen, R. G., Mandel, G., Meisler, M. H., Netter, Y. B., Noda, M., Tamkun, M. M., Waxman, S. G., Wood, J. N. & Catterall, W. A.: Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 28, 365-368 (2000)
  - 20) Shintani, T., Maeda, N. & Noda, M.: Receptor-like protein tyrosine phosphatase  $\gamma$  (RPTP  $\gamma$ ), but not PTP  $\zeta$  /RPTP  $\beta$ , inhibits NGF-induced neurite outgrowth in PC12D cells. *Dev. Neurosci.*, 23, 55-69 (2001)
  - 21) Qi, M., Ikematsu, S., Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Sakuma, S., Noda, M., Muramatsu, T. and Kadomatsu, K.: Haptotactic migration induced by midkine: Involvement of protein-tyrosine phosphatase  $\zeta$ , mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 276, 15868-15875 (2001)
  - 22) Kawachi, H., Fujikawa, A., Maeda, N. and Noda, M.: Identification of GIT1/Cat-1 as a substrate molecule of protein tyrosine phosphatase  $\zeta/\beta$  by the yeast substrate-trapping system. *PNAS*, 98, 6593-6598 (2001)
  - 23) Sugawara, T., Tsurubuchi, Y., Agarwala, K. L., Ito, M., Fukuma, G., Mazaki-Miyazaki, E., Nagafuji, H., Noda, M., Imoto, K., Wada, K., Mitsudome, A., Kaneko, S., Montal, M., Nagata, K., Hirose, S. and Yamakawa, K.: A missense mutation of the  $\text{Na}^+$  channel  $\alpha_{II}$  subunit gene *Na<sub>v</sub>1.2* in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. *PNAS*, 98, 6384-6389 (2001)
  - 24) Sakuta, H., Suzuki, R., Takahashi, H., Kato, A., Shintani, T., Iemura, S., Yamamoto, T.S., Ueno, N. and Noda, M.: Ventroptin: A novel BMP-4 antagonist expressed in a double- gradient pattern in the retina. *Science*, 293, 111-115 (2001)
- 1) 前田信明、野田昌晴：軸索誘導の制御因子としてのプロテオグリカン 生体の科学、48, 534-538 (1997)

- 2) 西塚雅子、中村和昭、新井 康、町田武生、前田信明、野田昌晴：発生過程の大脳皮質ニューロンにおける 6B4 proteoglycan/phosphacan 解剖学誌、73, 416 (1998)
- 3) 門松健治：ヘパリン結合性成長因子、ミッドカインの発見と機能解析 生化学、70, 1315-1325 (1998)
- 4) 門松健治：Midkine と Pleiotrophin」BioScience 用語ライブラリー（宮園浩平、菅村和夫編）羊土社、126-127 (1998)
- 5) 西塚雅子、村上志津子、前田信明、野田昌晴：ヒト胚の嗅板由来の組織における 6B4 proteoglycan/phosphacan 解剖学誌、74, 47 (1999)
- 6) 湯浅一河田純一、野田昌晴：網膜視蓋投射系における領域特異的神経結合形成の分子機構 蛋白質核酸酵素、45, 307-315 (2000)
- 7) 前田信明：受容体型蛋白質チロシンホスファターゼ PTP $\alpha$ /RPTP $\beta$ による神経機能調節 脳の科学、22, 1127-1132 (2000)
- 8) 前田信明：PTP $\alpha$ のシグナル伝達機構と脳の形態形成 細胞工学、20, 1107-1113 (2001)
- 9) 新谷隆史、野田昌晴：網膜における領域特異化の分子機構 医学のあゆみ、印刷中 (2001)
- 10) 新谷隆史、野田昌晴：網膜視蓋投射形成の分子機構 実験医学増刊号、印刷中(2001)

(2) 特許出願

① 国内

1. 野田昌晴、渡辺英治「GAP-lacZ リポーター遺伝子を用いる神経可視化法」2000-223176号 (2000.7.24)
2. 野田昌晴、藤川顕寛「PTP $\alpha$ 活性促進又は抑制物質のスクリーニング法」2000-223184号 (2000.7.24)
3. 野田昌晴、渡辺英治「Nav2 チャネル遺伝子欠損非ヒト動物」2000-241637号 (2000.8.4)

② 海外

1. 野田昌晴、渡辺英治「Nav2 チャネル遺伝子欠損非ヒト動物」米国 (09/920, 653 号) EP (01306609.7 号) (2001.8.3)
2. 野田昌晴、藤川顕寛「PTP $\alpha$ 活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法」米国、カナダ、EP (PCT/JP01/06343 号) (2001.7.23)

(4) 受賞、新聞報道等

① 受賞

なし

② 新聞報道

1. Watanabe et al. (2000) Na<sub>v</sub>2/NaG channel is involved in control of salt intake behavior in the central nervous system. J. Neurosci., 20, 7743-7751. に関する新聞記事
  - ・中日新聞 2000.10.17 付朝刊
  - 「塩分 “センサー” マウス脳で特定 『将来は高血圧治療に』」

- 日刊工業新聞 2000.10.17 付  
「塩分センサー確認 体液濃度の維持機構解明へ」
  
- 2. Sakuta et al. (2001) Ventroptin: A novel BMP-4 antagonist expressed in a double-gradient pattern in the retina. *Science*, 293, 111-115. に関する新聞記事
  - 日刊工業新聞 2001.7.6  
「胚発生期の細胞 位置決めタンパク質発見 神経再生医療に応用も」
  - 科学新聞 2001.7.13  
「網膜内の位置関係決定タンパク質発見 基生研の野田教授ら世界初」
  - 朝日新聞（東京版）2001.9.21  
「見る仕組み見えてきた 目と脳の結びつき解く」