

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 網膜内領域特異化と視神経の発生・再生機構

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

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)

主たる共同研究者

加藤 聖 (金沢大学大学院医学系研究科 教授)

3. 研究内容及び成果:

視神経の中樞への投射(網膜視蓋投射)は、神経系でよく見られるトポグラフィックな神経結合の代表例である。発生期ニワトリ網膜において前後軸、背腹軸方向に領域特異的(あるいは、勾配をもって)発現をする分子群の機能と相互関係の解明から、網膜内の領域特異化とその後生じるトポグラフィックな視神経投射の両メカニズムを明らかにする研究を展開した。また、視神経再生機構の研究として、再生能をもつ動物で再生期特異的に網膜において発現変動する遺伝子の同定とその機能を明らかにする研究を行った。

(1) 網膜内領域特異化の分子機構の解明(野田グループ)

網膜において前後軸、背腹軸方向の領域特異化を司る遺伝子カスケードが概ね明らかとなった。発生2-8日にかけて、前/後軸方向にはFgf8→CBF1/CBF2→SOH1, GH6→ephrinA5/EphA3というカスケードが存在し、背/腹軸方向にはBMP4/VOPT→BMP2/VOPT→Tbx2,3,5/cVax→ephrin-B1, -B2/EphB2, B3, ephrin-A2というカスケードが存在する。特筆すべき発見としては、①前後軸方向の領域特異化のマスター遺伝子である転写調節因子CBF1/CBF2の下流遺伝子の発現調節機構が判明したこと、②背腹軸は、実際に視神経が投射を始めるE6から後方に傾斜し、もはや前後軸に対して垂直ではないこと、③この傾斜には、BMP4からBMP2への遺伝子発現の交替と、CBF-1によるBMPシグナルの抑制という、2つのメカニズムが関与していること、④背腹軸方向では、領域特異化だけでなくその維持にもBMPシグナルが決定的な役割を担っていること、⑤これまで前後軸方向のトポグラフィック分子と思われていたephrin-A2が、BMP2の支配下にありE6から発現を開始すること、また、実は傾斜した背腹軸方向の勾配分子であること、が挙げられる。

(2) 領域特異的神経結合形成の分子機構の解明(野田グループ)

視神経の視中樞への領域特異的投射には、EphA/ephrin-A(前後軸方向)、EphB/ephrin-B(背腹軸方向)の受容体/リガンド系によるシグナル伝達関わっている。我々は、受容体型プロテインチロシンホスファターゼ(RTP)の1つ、Ptproが、EphA, Bの両者を基質としており、ephrinによるEphの活性化を抑制する役割を担っていることを見出した。更に、網膜視蓋投射系を用いて、Ptproの活性を制御することによって、*in vivo*の視神経の視蓋中での投射部位を人為的に変えることを示した。また、神経軸索の分岐、シナプスの除去に関与する新規免疫グロブリンファミリー分泌因子、微小管と細胞膜の連結に関わる新規leucine-rich repeat含有分子、微小管に結合して神経軸索の分岐を制御する新規のCRMP分子等、多くの新規分子の同定に成功した。

(3) 再生期視神経に特異的に発現する分子の同定

視神経の再生能を有する魚類と有しない哺乳動物における除神経後の遺伝子発現の違いを明らかにし、再生のための分子機構の解明を目指した。

#### 1) DNAマイクロアレイによる解析(野田グループ)

キンギョとマウスの視神経を切断後、網膜において発現が変化する遺伝子群の網羅的解析を行ない、キンギョにおいて特異的に視神経再生に伴って発現が変化する遺伝子群を同定した。また、マウスにおいて視神経再生が起こる条件下(zymosan投与下での除神経)において発現の変化する遺伝子群を同定した。

#### 2) ディファレンシャル・ディスプレイ法による解析(加藤グループ)

視神経再生の初期、中期、後期に分けて、発現が変化する分子を探索した。この結果、プルプリン(新規レチノール結合分子)、トランスグルタミナーゼ、GAP-43等を見出し、詳細な解析を行なった。再生可能なキンギョではIGF-I $\uparrow$ →p-Akt $\uparrow$ →Bcl-2 $\uparrow$ →カスパーゼ3 $\downarrow$ 、一方、再生不能のラットではIGF-I $\downarrow$ →p-AktA $\downarrow$ →Bax $\uparrow$ →カスパーゼ3 $\uparrow$ という逆の反応が生じることが判明した。この違いが網膜神経節細胞の生存/死の決定に関わっていると思われる。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た。

#### (4) 受容体型プロテインチロシンホスファターゼ(RPTP)の機能的役割(野田グループ)

我々は、当初計画に加えて、受容体型プロテインチロシンキナーゼ(RPTK)に較べて世界的に研究の遅れているRPTP研究の推進を計画した。Ptpzをモデルとして、PTPの基質分子同定法の開発に着手し、Yeast two-hybrid systemを応用したYeast substrate-trapping systemの開発に成功した。この方法を用いて、Ptpzの基質分子と数多くの相互作用分子の同定に成功した。その結果、Ptpzは、Git1 (Arf-GAP)やp190 RhoGAP等を基質とし、PSD-95やMAGI-3等のPDZドメインをもつ分子群とC末で結合していることが明らかになった。Ptpzは、pleiotrophin, midkineといったリガンド分子の結合によって集合し、不活化するという機構によって制御されていることが初めて判明した。Ptpz遺伝子の欠損マウスの解析では、海馬LTPや海馬依存性学習の異常が明らかになり、シナプス可塑性におけるPtpzの役割を実証した。

また、Ptpzの別の役割として、胃の粘膜上皮細胞において、*H. pylori*の分泌するVacA毒素の受容体として機能していることを発見した。VacAは細胞空胞化作用によって細胞毒性を発揮しているという説を覆し、VacAがPtpzの偽リガンド分子として誤ったチロシンリン酸化シグナルを発生することが真の胃潰瘍の原因であるという説を提出した。更に、RPTPの基質同定法の確立によって、上記のPtpzやPtpz以外の、数多くのRPTPの基質分子の同定に成功した。

### 4. 事後評価結果

#### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

脊椎動物の網膜からその視神経軸索が視蓋へ投射するパターンは、基本的に二次面から二次面への対応付けが行われる結果と理解されている。本研究はその分子機構を現代的な分子生物学の手法で明らかにしようとするもので、まずニワトリ網膜および視蓋の領域化を、領域特異的な発現遺伝子の同定から始め、ephrin-Ephリセプター系と拮抗して働くレセプター型フォスファターゼの重要性を発見した。脳神経の領域化にTyr及びSer/Thrのリン酸化機構、神経回路形成にTyrのリン酸化機構が関与することの証明は、この分野への重要な貢献であった。またこれらの研究過程で、従来は直交すると考えられてきた前後軸と背腹軸が少し傾いていることの発見などもあった。またレセプター型フォスファターゼであるPtpzがピロリ菌の受容体であることの発見など、当初の予想を超えた研究展開もあった。さらにニワトリ視覚系で解明した分子機構を踏まえてマウスの視覚系の発現遺伝子の網羅的スクリーニングで新しい遺伝子の発見につながるなどの貢献をした。共同研究者との協力では、金魚網膜の再生過程の研究をおこなった。この研究展開は将来の再生医学応用などを考えると興味深いものである。本研究期間内ではまだ準備段階を終えたところで成果の達成には達していると評価できないが、実験系の再評価も含めて将来の網膜神経系の再生過程の研究をさらに発展させてほしい。以上の研究は多数

の論文として国際誌に発表されており、そのうち主要なものはNat. Genet., Nat. Neurosci., J. Biol. Chem.等のトップジャーナルに発表されている。なかでもチロシンフォスファターゼによるEphの機能抑制の論文は高く評価される。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

網膜・視蓋神経投射の研究はその幾何学的パターンの整然さを利用した研究が以前から行われてきたが、最近では研究者がやや減少しているように見受けられる。その中で本研究は最新の分子生物学的技術を駆使して挑戦し、新しい局面を切り開こうとするものである。特にゲノム研究やプロテオミックス研究からのインプットで再武装した神経回路形成の研究の一つの方向を示した功績は高い。

#### 4-3. その他の特記事項

なし