

「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(topographic projection)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、これらの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。

本年度も引き続き、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、CBF-1 及び CBF-2、並びに Ventroptin と BMP ファミリー分子を中心に解析を進めた結果、網膜の前後軸と背腹軸の両軸方向に同調的に領域特異性が形成されるというカスケードの全容が明らかになりつつある。一方、領域特異的結合形成の分子機構については、受容体型チロシンホスファターゼ(RPTP)である Ptpro が、受容体型チロシンキナーゼの Eph の活性を負に制御することにより、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明らかになった。さらに、軸索の分岐形成やシナプス形成、リファインメントに機能することが予想される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 を有する新規分子について詳細な解析を進めた。

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、独自に作製したキンギョの DNA マイクロアレイを用いて、視神経切断後、時間を追って発現が変化する遺伝子群のクラスター解析を行い、視神経再生に伴って発現が変化する遺伝子群を明らかにした。一方、マウスに関しても、市販及び独自に作製した DNA マイクロアレイを用いて同様の解析を行い、視神経切断によって発現が変化する遺伝子群を明らかにした。また、神経系に発現するコンドロ

イチン硫酸プロテオグリカンの主要分子である受容体型チロシンホスファターゼ Ptpnz を欠損した遺伝子ノックアウトマウスにおいて、視神経再生の能力を解析する研究を開始した。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プルプリン、トランスグルタミナーゼ、GAP-43 を見出し詳細な解析を行っている。また、魚(キンギョ、ゼブラフィッシュ等)の視神経再生を評価するための行動解析装置の開発を継続して行っている。

## 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 法により同定した、前後軸方向に 33 分子、背腹軸方向に 20 分子、合計 53 の領域特異的発現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、あるいは、RNAi 等を用いて発現抑制をかけた胎仔において、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分布や、機能修飾を行った分子を発現させた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

##### ①CBF-1 と CBF-2 による前後軸方向の領域特異化

CBF1、CBF-2 は網膜においてそれぞれ前、後領域の特異化を担う Winged-helix 型の転写調節因子である。前年度までの研究により、CBF-1 が網膜前側の領域特異化を制御するマスター遺伝子であること、CBF-2 は CBF-1 と相互にその発現を抑制し合い、SOHo1, GH6, EphA3 等の下流分子の領域特異的発現を制御していることを報告した。本年度は、網膜において二重勾配をもって発現する分子に対する CBF-2 の制御について検討した。CBF-1 が BMP シグナルを抑制的に制御して、BMP-2 およびその下流分子である ephrin-A2 の発現を調節するのに対し、CBF-2 の異所的発現によって BMP-2 や ephrin-A2 の発現変化は認められなかった。このことから、CBF-1、CBF-2 による網膜領域特異化の制御において、制御する下流分子に違いがあることが明らかとなった。また、CBF-2 の作用機構については CBF-2 と Even-skipped の転写抑制ドメインをつないだ抑制型コンストラクト等の網膜への遺伝子導入実験から、CBF-2 が網膜において転写抑制因子として機能していることが明らかになった。

##### ②Ventroptin と BMP ファミリー分子による領域特異化

これまでの研究により、BMP の中和分子である Ventroptin は、発生初期網膜においては BMP-4 の、発生後期においては BMP-2 の活性を調節することにより、背腹・前後両軸方向に

おける網膜視蓋投射を制御することを明らかにしている。BMP-4、BMP-2 は共に **Ventropin** と相補的に発現する。BMP-4 が発生初期に網膜の背側で発現し、その後消失していくのに対し、BMP-2 は発生後期(E6 以降)に背・後側で発現を開始する。これに合せて、**Ventropin** は初期には腹側で発現するが、後期には腹・前側で発現するようになる。発生後期における網膜視蓋投射制御機構を解析するため、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を開発した。これを用いて、BMP-2 の発現レベルを変化させ、その影響を検討した結果、Tbx5、cVax、**ephrin-B1**、**EphB2** といった背腹軸方向の領域特異的分子のすべてと、前後軸において領域特異的に発現することが知られていた **ephrin-A2** が、BMP-2 の支配下にあることが判明した。また、予想通り、これらの BMP-2 支配下の領域特異的分子はすべて BMP-2 や **Ventropin** と同様に発生後期の網膜において二重勾配を持って発現していることも明らかになった。以上の結果より、BMP-4 から BMP-2 への切り替えに伴って背腹軸そのものが後方へ傾斜し、これにより背腹・前後の両軸は直交しない形で網膜視蓋投射が制御されていると考えられる。この知見を支持するように、BMP-2 の発現を抑制した場合には、**Ventropin**を過剰発現させた場合と同様に、背腹・前後両軸方向において網膜視蓋投射に異常が生じた。

従来、前後軸・背腹軸における網膜視蓋投射は、それぞれ独立に決定されると考えられてきた。しかしながら我々の研究により、両軸方向の投射形成は独立しておらず、協調的に進むことが判明した。また、背腹軸方向における網膜内の領域特異性は発生初期に決定し、その後は不可変であるとされていたが、発生後期においても網膜内の細胞における領域特異性は可塑性を有していることが明らかになった。

## 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 **Ptpro(CRYP-2)**

網膜の後側で高く、前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 **Ptpro(CRYP-2)**について解析を行っている。前年度までの成果として、**Ptpro** が **EphA** および **EphB** を基質とすること、また、その基質サイトは、**Eph** の活性化の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であることを見出している。本年度は、領域特異的神経結合形成における **Ptpro** の機能を明らかにするために、野生型及びドミナントネガティブ型の **Ptpro** を発現するコンストラクトを作成し、網膜神経節細胞に導入・発現させ、視神経軸索の挙動を *in vitro* 及び *in vivo* において解析した。

**Eph** の発現量(活性)は、網膜の後側で高く、前側で低い。一方、リガンドの **ephrin** は視蓋の後側で高く、前側で低い勾配を示す。このため、後側の視神経は **ephrin** に強く反応し、この結果、視蓋の後側には侵入できない。一方、前側の視神経は **ephrin** に対する反応性が低く、視蓋の後側に投射する。網膜の器官培養系を用いた *in vitro* の解析において、野生型 **Ptpro** の過剰発現により、後側視神経軸索の **ephrin** に対する反応性の低下が観察された。逆に、ドミナントネガティブ型の **Ptpro** を発現させると、前側視神経の **ephrin** に対する反応性の上昇(獲

得)が観察された。さらに同様の発現コンストラクトを用いて、個体レベルにおける解析を行ったところ、野生型 *Ptpro* の過剰発現により、後側視神経が正常な投射位置を通り過ぎて、視蓋の後側まで侵入する異常が観察された。また、ドミナントネガティブ型 *Ptpro* の発現により、前側視神経が本来の投射位置より手前で停止することが観察された。以上の結果から、*Ptpro* は *Eph* の活性を負に制御することにより、領域特異的神経結合形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。現在 RNAi を用いてニワトリ網膜における *Ptpro* の発現を抑制した場合の影響を解析するとともに、ノックアウトマウスを用いた解析を開始したところである。

## ②受容体型プロテインチロシンホスファターゼ *Ptprz*

*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、そのシグナル伝達機構を明らかにしつつある。*Ptprz* 遺伝子から生成する分子種を詳細に解析した結果、従来知られていた3種のスプライス・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。マウス網膜においては、開眼時期に *Ptprz-S* が時期特異的に発現していること、成熟するに従い、網膜で発現するほとんどの *Ptprz* が新規に見いだされた一つのアイソフォームだけになるという興味深い知見を得た。in vitro 及び in vivo における解析の結果、この新規アイソフォームは、受容体型アイソフォームのタンパク質シェディング(shedding)による産物であることが判明した。*Ptprz* 欠損マウスの網膜に目立った組織学的変化は同定されていないが、自発運動の活動概日リズムが、消灯後の暗期前半においてのみ低下していることを見出している。今後、開眼時期の視神経の発達について検討する予定である。

RPTP の多く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、これを打破すべく、原理上すべての PTP に応用可能な基質分子の探索法、Yeast substrate-trapping system を開発した。酵母の two-hybrid 法を応用した本法は、PTP の活性中心依存的相互作用を用いて基質分子を検出するものである。本法を用いたスクリーニングにより、*Git1*, *p190RhoGAP*, *PIST*, *MAGI-1* を *Ptprz* の基質候補として同定した。*Ptprz* 欠損マウスでは、成熟依存的な空間学習能力の低下とそれに対応した海馬 CA1 領域における長期増強(LTP)レベルの有意な亢進がこれまでに報告していた。この異常な LTP 亢進分は、Rho 結合性キナーゼ(ROCK)阻害剤によってキャンセルされること、及び、*Ptprz* の基質の一つである *p190RhoGAP* は Rho シグナルを負に調節することから、*Ptprz* 欠損マウスにおいては *p190RhoGAP*-Rho シグナルの異常がシナプス可塑性の異常の原因になっていることが推測された。実際、海馬依存性の恐怖条件付け学習の前後における野生型と *Ptprz* 欠損マウスの海馬 *p190RhoGAP* のリン酸化変化に有意な差異が認められた。

また、*Ptprz* 欠損マウスは覚せい剤メタンフェタミンに対して低感受性を示すことを見いだしており、ドーパミン神経系の機能的変化が推定された。実際、*Ptprz* 遺伝子欠損マウスではメタンフェタミン投与後の線条体のドーパミン取り込み活性が低下していることが明らかになった。今後、これに関わる *Ptprz* シグナルカスケードを解明する予定である。

## 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(Ig)ドメインを2個有する新規分泌性分子が、網膜の背・後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されている。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。

ニワトリにおいて本分子の発現を RNAi により抑制すると、網膜背側視神経の **terminal zone** が、視蓋の広い領域に分散した状態に変化することが明らかになった。さらに、この時、視蓋の層形成にも異常が生じていることが明らかになり、本分子は、視神経軸索より分泌され、投射先の細胞分化や層形成を制御するという全く新しい機能をもった分子である可能性が出てきた。現在、視蓋の層形成に及ぼす影響について詳細な解析を進めている。

#### 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。本分子を網膜において強制発現させると、背側の視神経の終末においてその走行が異常を示すことが判明している。このような異常は、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に認められることから、本分子はシナプス形成やリファインメントにおいて機能することが推測されている。本年度は、本分子が関与する分子機構を明らかにする目的で、本分子の細胞内領域に結合する分子について、従来の **yeast two-hybrid** 法を用いて探索を行った。その結果、細胞骨格の伸長を制御する分子と結合することが明らかになった。現在、この結合の生理的な意義について解析を進めている。

### 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、再生の初期に機能する鍵となる分子の同定を目指している。

##### ① キンギョ視神経切断時の遺伝子変化の解析

視神経切断前後のキンギョの網膜及び視蓋等より調製した約7万クローンの cDNA の塩基配列を基にして、42K のオリゴ DNA マイクロアレイを独自に作製した。この DNA マイクロアレイを用いて、視神経切断後、時間を追って発現が変化する遺伝子群のクラスター解析を行い、視神経再生に伴って発現が変化する遺伝子群を明らかにした。マウスのマイクロアレイ解析から得られた結果と比較することによって、キンギョにおいて再生に関与していると思われる遺伝子を選定し、全長 cDNA クローンの単離と塩基配列決定を進めている。

## ② マウス視神経切断時の遺伝子変化の解析

公的データベースの cDNA 配列情報を利用して、マウスについて 44K のオリゴ DNA マイクロアレイを独自に作製した。この DNA マイクロアレイ及び市販の 22K DNA マイクロアレイを用いて、視神経切断後、時間を追って発現が変化する遺伝子群を同定し、そのクラスター解析を行った。

## ③ 受容体型プロテインチロシンホスファターゼ Ptprz

哺乳類などの中枢神経系においては、傷害により形成されたグリア瘢痕が再生軸索の伸長を抑制することが知られている。グリア瘢痕中には様々な分子が存在するが、中でもコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが主な抑制因子として機能していると考えられている。Ptprz は中枢に発現する主要なコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであることから、再生抑制因子として機能している可能性が考えられた。そこで、Ptprz 欠損マウスの視神経を用いて、この可能性について検討した。野生型マウスにおいては、傷害を受けた視神経は傷害部位を越えて伸長することは無かったが、Ptprz 欠損マウスにおいては、視神経軸索が傷害部位を大きく乗り越えて再伸長するのが観察された。今後、詳細な解析を行う予定である。

## B) 金沢大学グループ

キンギョやゼブラフィッシュを用い、視神経を切断し視覚が完全に回復するまでの時期(準備期、軸索再伸長期、視蓋でのシナプス結合、再編成期)を区別し、各時期において特異的に機能する分子を見つけ、その役割を検討する。

### ① プルプリンの役割

プルプリンはキンギョで 2-5 日、ゼブラフィッシュでは 1-3 日でピークとなり 7-10 日で正常に戻った。また、その局在は視細胞に局限していた。またゲノム DNA のクローニングの結果エクソン 6 個、イントロン 5 個から成り、5' 上流 1.9 Kbp の転写調節領域の塩基配列を決定した。今後プルプリン遺伝子の転写を調べることにより、再生開始シグナルの更なる上流分子について検索を進めたい。

### 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はキンギョでは損傷後 10-40 日、ゼブラフィッシュでは 7-25 日にかけて上昇していた。その増加の局在は神経節細胞であった。この時期は軸索伸長期なので神経突起伸長を期待し、網膜片培養にてリコンビナント蛋白を添加したところ、キンギョおよびラット成熟網膜からの突起伸展を著明に促進し、特異的抗体や RNAi では逆に抑えられた。今後、視覚系でトランスグルタミナーゼの *in vivo* の軸索再生効果を解析する。

### ③ GAP-43 の役割

成長関連蛋白 (GAP-43) は切断後から網膜で発現が増加し、視覚機能が回復するまでのキンギョで 200 日、ゼブラフィッシュで 100 日と長期間にわたる発現上昇が見られた。また、本分子は神経節細胞および視神経線維層に局在していた。

### ④ 小型魚類用行動解析装置の開発

魚の視覚機能がいつ完全に回復するかは判明していない。そこで我々は自作した画像処理装置を使い、視神経切断した2匹の魚の追尾行動(1匹の魚を他の1匹が追跡する行動)を経時的に観察した。この結果、正常に回復するのにキンギョで約180日、ゼブラフィッシュで約100日かかることが判明した。この時期を考慮して視蓋におけるシナプス再編成に働く分子を同定しようと考えている。

### 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

- Noda, M. (2006) The subfornical organ, a specialized sodium channel, and the sensing of sodium levels in the brain. **The Neuroscientist** 12, 80-91.
- Watanabe, E., Hiyama, T.Y., Shimizu, H., Kodama, R., Hayashi, N., Miyata, S., Yanagawa, Y., Obata, K. and Noda, M. (2006) Sodium-level-sensitive sodium channel  $Na_x$  is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 290, 568-576.
- Tamura, H., Fukada, M., Fujikawa, A. and Noda, M. (2006) Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is involved in hippocampus-dependent memory formation through dephosphorylation at Y1105 on p190 RhoGAP. **Neurosci. Letts.**, Epub ahead of print, PMID: 16513268.
- Fukada, M. and Noda, M. (2006) Yeast substrate-trapping system for isolating substrates of protein tyrosine phosphatases. **Methods in Mol. Biol.**, in press.
- 田中聖之 (2006) 「ゼブラフィッシュプルプリン遺伝子クローニングと視神経再生網膜における発現」 **十全医学会誌** 115 (1), 2-9.

(2) 特許出願

H17年度出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：1件）