

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18370092

研究課題名(和文) ゼブラフィッシュ網膜における層構造形成のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism underlying retinal lamination in zebrafish

研究代表者

政井 一郎 (MASAI ICHIRO)

独立行政法人 沖縄科学技術研究基盤整備機構・神経発生ユニット・代表研究者

研究者番号：50242087

研究成果の概要：

脊椎動物の網膜には、大きく6種類の神経細胞が分化し、層構造を形成する。我々の研究から、網膜における層構造形成には、接着分子であるN-cadherinが重要であることが示唆されている。本研究では、網膜分化におけるN-cadherinの役割について研究を行った。その結果、N-cadherinは、網膜前駆細胞が神経細胞分化のステップに入るのに重要であること、また、神経細胞分化の後には、視神経が眼球から出て視蓋へ投射するステップに重要であることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞分化、神経回路、網膜、細胞接着、N-cadherin、遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の網膜には、光受容に関わる視細胞をはじめ、大きく6種類の神経細胞が分化し、層構造を形成する。このような層構造は脳の多くの領域で観察されるが、その形成を制御するメカニズムはまだ不明な点が多い。我々は、以前、魚類であるゼブラフィッシュをモデル動物として、大規模な突然変異体のスクリーニングを行い、網膜の層構造形成に異常を示す突然変異体を多数同定してきた。その中のひとつである *parachute* (*pac*) 突然変異

体について、責任遺伝子を同定したところ、細胞接着因子である N-cadherin をコードすることが明らかになった。N-cadherin は細胞接着を促進する機能のほか、上皮での接着帯の構成要素でもある。ゼブラフィッシュ *pac* 突然変異体に関する我々の解析から、N-cadherin の欠損は、網膜神経上皮の接着帯を崩壊させ、細胞極性の喪失を引き起こすことが明らかになった。*pac* 突然変異体では、網膜上皮の細胞極性の喪失に伴い、通常神経上皮の頂頭部で起こる細胞分裂が基底膜側

でも異所的に起こる。その結果、細胞分裂後に生まれる神経細胞が正常に移動できず、層構造が異常になると考えられる。しかし、*pac* 突然変異体の弱いアレルでは、網膜神経上皮の接着帯は正常に形成されるにも関わらず、層構造の形成に異常を示す。このことから、N-cadherin は、接着帯の維持以外に、網膜細胞分化や層構造形成に過程においてさまざまな機能を担っている可能性が示唆される。しかし、その詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、網膜での神経細胞分化および層構造形成において多彩な機能を担う N-cadherin の役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) N-cadherin の網膜での役割を明確にするためには、網膜での細胞分化の各ステップで、N-cadherin の活性を抑制し、その表現型を解析することが必要である。その方法として、網膜分化の様々な段階において、N-cadherin の機能を阻害したゼブラフィッシュ個体を作製する。具体的には、*pac* 突然変異体の強いアレルに対して、網膜細胞分化の各時期に特異的に発現を誘導するエンハンサーもしくはプロモーターを利用して、野生型の N-cadherin を強制的に発現させる。この個体では、野生型の N-cadherin が発現している時期のみ、N-cadherin の機能が回復することから、網膜分化における各時期における N-cadherin の機能を抽出できる。これらの個体について、網膜細胞分化における表現型の解析を行った。

(2) 我々は以前の研究から、*pac* 突然変異体の網膜では、6種類の網膜神経細胞は正常に特異化されるが、細胞極性が維持できず、層構造の形成に異常をきたすことを報告した。しかし、*pac* 突然変異体において網膜での神経細胞分化を厳密に解析する中で、増殖細胞の割合が野生型に比べ高く、神経細胞分化が遅延していることを発見した。多くの癌では、細胞極性の欠損と細胞の過剰増殖が関連していることが知られており、細胞極性と細胞分化・増殖の関係は医学的な観点からも重要なテーマとなっている。本研究では、*pac* 突然変異体をモデルに、細胞極性の網膜神経細胞分化に及ぼす影響を解析することで、N-cadherin の網膜での神経細胞分化における役割を研究した。

## 4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ網膜において細胞分化の様々な段階で、N-cadherin の機能を抑制する目的で、*pac* 突然変異体の遺伝的背景に、Gal4-UAS システムを利用して、野生型の N-cadherin を発現させた個体を作製した (図 1)。

手順としては、野生型の N-cadherin を安定的に発現させるために、UAS 配列に N-cadherin を接続した DNA コンストラクト「UAS: myc-tagged N-cadherin」を作製し、それをゲノムに挿入したトランスジェニック系統を作製した。さらに、網膜の神経細胞で特異的に発現を誘導するエンハンサーとして *ath5* 遺伝子を選定し、その *ath5* エンハンサーに Gal4VP16 を接続した DNA コンストラクト「*ath5*: GAL4VP16」を作製し、こちらもトランスジェニック系統を作製した。ゼブラフィッシュでは卵から成魚まで成長するのに 4~6 ヶ月要するが、これらトランスジェニック系統の作製には 2 世代必要なため、約一年かけて作製した。

次に、これらの「*ath5*: GAL4VP16」と「

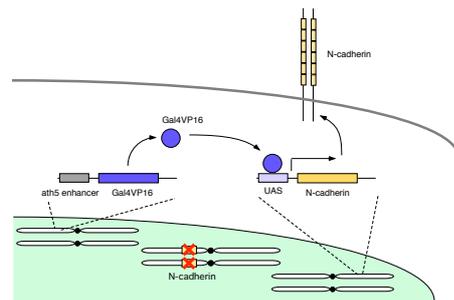


図 1 Gal4-UAS システムを用いた N-cadherin の発現方法。N-cadherin の変異体において、N-cadherin を発現することで、組織および時期特異的に N-cadherin の活性をレスキューした個体を作製する。

UAS:myc-tagged N-cadherin」のトランスジェニック系統を、それぞれ、*pac* 変異体のヘテロ接合体の魚と交配し、次世代において N-cadherin の変異をこれらのトランスジェニック系統の遺伝的背景に挿入した。そして、それぞれの次世代の魚から、*pac* 変異とトランスジーンをヘテロ接合体で持つ個体を同定し、交配した結果、第二世代で、2つのトランスジーンを同時に持つ *pac* ホモ接合体突然変異体を得ることができた。

この個体を解析した結果、*pac*変異体で見られる網膜層構造の異常はレスキューされなかった(図2)。このことは、網膜神経細胞で発現するN-cadherinでは層構造形成をレスキューするのは不十分であり、網膜前駆細胞で

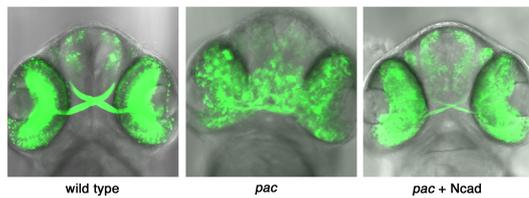


図2 野生型(左)、*pac* 変異体(中)、N-cadherin を *ath5* エンハンサーで発現した *pac* 変異体(右)。網膜神経細胞を *ath5*:GFP で可視化している。N-cadherin を発現した *pac* 変異体(右)では、網膜の層構造は異常だが、視神経の走行および網膜と脳の境界面の維持は回復している。

のN-cadherinが層構造の形成に必須であることを示している。また、我々は以前、*pac*突然変異体では、視神経の交叉異常や、網膜神経細胞が脳内へ侵入する表現型を示すことを報告したが、*ath5*:Gal4VP16とUAS:N-cadherinの導入で、これらの表現型は回復した(図2)。このことから、視神経の伸長やそれに伴う網膜と脳の境界面の維持には、神経細胞でN-cadherinが発現することが重要であることが明らかになった。

(2)多くの癌では、過剰な細胞増殖が起こるが、それと同時に細胞極性の異常も観察される。しかし、細胞極性の異常が、細胞の過剰増殖を引き起こす要因となるのか、逆に、異常な細胞増殖の結果、細胞極性が崩壊するのか、まだ不明である。我々は、以前、網膜において細胞極性に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体について報告した。これらの変異体は本研究で主題にしている

N-cadherin 以外に、細胞極性の確立に重要な Stardust/Crumbs 複合体、Par3/Par6/aPKC 複合体の突然変異体も含まれている。我々は、これらの変異体において、網膜の神経細胞分化が起きる受精後24時間から72時間の時期に、増殖細胞の割合が増加していることを見出した(図3)。そこで、N-cadherinに変異が起きている *pac* 突然変異体に焦点をあて、細胞増殖率や、神経細胞へ分化する割合について調べた。その結果、*pac* 変異体において、網膜細胞の増殖率は野生型に比べて変化がないこと、他方、神経細胞の割合が減少していることを発見した(図4C)。この結果は、N-cadherinの欠損により、細胞増殖は活性化していないが、神経細胞へ分化する過程が抑制されていることを示している。

我々の以前の研究から、*ath5* 遺伝子は網膜前駆細胞が最終分裂する G2 期から発現し、

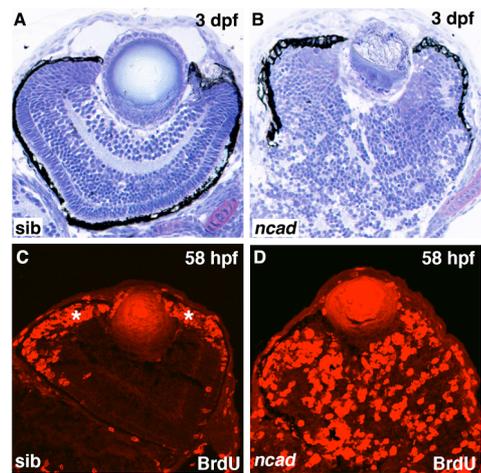


図3 野生型と *pac* 変異体の網膜の3日目胚の切片(A, B)およびBrdU取り込み像(C, D)。野生型と比較して、*pac* 変異体では網膜でのBrdU陽性細胞の割合が増えている(C, D)。

その後、生まれた神経細胞に発現が引き継がれることが明らかになっている(図4A)。そこで、*ath5* 遺伝子エンハンサーにGFPを接続した *ath5*:GFP をもつトランスジェニック

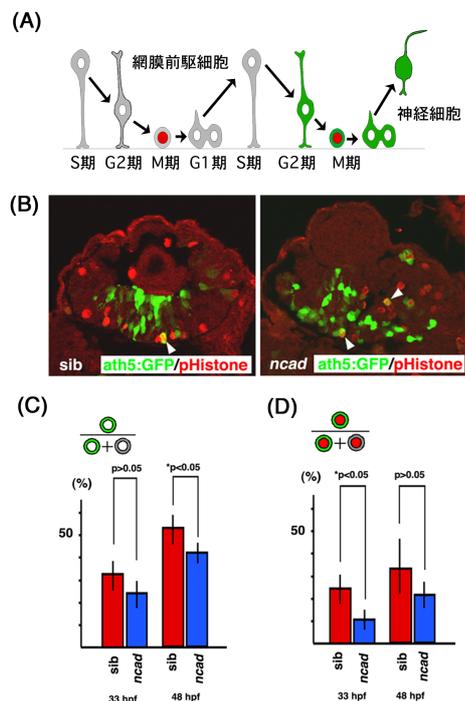


図4 *pac* 変異体では、増殖性の細胞分裂から神経細胞分化を担う細胞分裂へ分裂様式の切り替えに異常がある。(A) 緑: *ath5*:GFP 陽性細胞、赤: リン酸化ヒストン H3 陽性細胞、(B) *ath5*:GFP とリン酸化ヒストンの二重染色像、(C) *ath5* 陽性細胞(神経細胞)の割合、(D) 神経細胞をつくる細胞分裂の割合

系統を *pac* 変異体の背景に入れ、*ath5*:GFP と M 期分裂細胞のマーカーであるリン酸化ヒストン H3 の二重染色を行った。この染色では、*ath5*:GFP とリン酸化ヒストン H3 の二重陽性細胞は、神経細胞を生み出す最終分裂を示し、他方、*ath5*:GFP 陰性/リン酸化ヒストン H3 陽性細胞は娘細胞が再び細胞周期に入る増殖性の細胞分裂を表している。従って、この二重染色により、神経細胞をつくる細胞分裂と増殖性の細胞分裂の様式を区別することができる (図 4A)。

これら 2 つの分裂様式の比率を、*pac* 変異体の網膜で時期を追って比較したところ、*ath5*:GFP/リン酸化ヒストン H3 の二重陽性細胞の比率が減少していることが明らかになった (図 4BD)。このことから、N-cadherin の変異により、細胞極性が喪失した場合、増殖性の細胞分裂から神経細胞を分化させる細胞分裂へ切り替えに異常を示すことが明らかになった。このことから、ゼブラフィッシュ網膜において、細胞極性は、神経細胞分化に重要であることが示唆された。

ゼブラフィッシュ網膜の神経細胞分化のステップは、Hedgehog (Hh) シグナル経路と Notch シグナル経路に依存することが我々の研究で明らかになっている。そこで、*pac* 変異体で観察される神経細胞分化の異常に、Hh もしくは Notch シグナル経路が関与するかどうか検討した。その結果、*pac* 変異体の表現型は、Notch シグナル経路の活性には依存しないが、Hh シグナル経路の活性レベルの影響を強く受けることが明らかになった。以上の結果から、N-cadherin を介して確立される細胞極性が、網膜における神経細胞分化のステップにおいて細胞分裂の様式変換に重要な役割を果たしていること、それは Hh シグナル経路に依存することが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 政井 一郎、 “ゼブラフィッシュ網膜における神経細胞分化の誘導および補償機構” 細胞工学 28, 52-58, 2009 (査読なし)

[学会発表] (計 5 件)

招待講演:

- ① Ichiro Masai, “Roles of DNA damage checkpoint and p53 in retinal neurogenesis in zebrafish”, the 2nd CNU International Symposium on Biology - Drug Discovery and Animal Models, Daejeon, Korea, 2009.
- ② Ichiro Masai, “Signaling pathways regulating neuronal differentiation

and maintenance in the zebrafish retina”, Gordon Research Conferences - visual system development”, IL Ciocco, Italy, May 14-19, 2006.

口頭発表:

- ③ Ichiro Masai, “Mechanism regulating apoptosis during retinal development”, Annual conference of the Japanese Society of Molecular Biology, Yokohama, Japan, December 11-15, 2007.
- ④ Ichiro Masai, “Signaling pathways regulating neuronal differentiation and maintenance in the zebrafish retina”, 2<sup>nd</sup> Asia-Oceania zebrafish meeting, Palau Tioman, Malaysia, October 9-11, 2006.
- ⑤ Ichiro Masai, “Mechanism underlying retinal neurogenesis in zebrafish”, OIST-Korea workshop “Neuroscience and beyond”, Okinawa, Japan, February 21-23, 2007.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

政井 一郎 (MASAI ICHIRO)

独立行政法人 沖縄科学技術研究基盤整備機構・神経発生ユニット・代表研究者

研究者番号: 50242087

(2) 研究分担者

山口 雅裕 (Yamaguchi Masahiro)

独立行政法人理化学研究所・独立主幹研究プログラム・ユニット研究員

研究者番号: 00360660

(3) 連携研究者

なし