

平成 23 年 5 月 25 日現在

研究種目：特定領域研究
研究期間：2005～2009
課題番号：17023003
研究課題名（和文）中脳視蓋の層形成と回路形成機構の解析
研究課題名（英文）Analysis of tectal layer formation and mechanisms of retinotectal projection.
研究代表者
仲村 春和（NAKAMURA HARUKAZU）
東北大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号：90079690

研究成果の概要（和文）：

視蓋は鳥類以下の脊椎動物の視覚の中樞で、視神経線維の位置特異的な投射を受ける。視蓋の位置特異性の決定に関して、視蓋で、耳側網膜からの線維を反発する EphrinA2 と A5 を指標にして解析したところ、視蓋、小脳のオーガナイザーとして働く Fgf8 が大きな役割を果たすこと、しかしその細胞内シグナルトランスダクションは異なっていること明らかになった。また、神経線維の新しいトレース法を考案し、その方法で視神経線維をラベルした結果、胚時期の一過的なものではあるが、今まで報告のない新しい網膜視蓋投射経路が見つかった。

研究成果の概要（英文）：

In lower vertebrates, optic tectum is the visual center and receives retinal fibers in a retinotopic manner. We have shown that Ephrin A2 and A5, which are expressed in the posterior tectum and repel temporal retinal fibers, are induced by Fgf8, but that signal transduction to induce Ephrin A2 and A5 are different. We have elaborated new fiber tracing method, and unraveled new but transient retinotectal pathway which invade deeper layer of the tectum from the first.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	25,000,000	0	25,000,000
2006 年度	21,400,000	0	21,400,000
2007 年度	21,100,000	0	21,100,000
2008 年度	20,700,000	0	20,700,000
2009 年度	20,900,000	0	20,900,000
総計	109,100,000	0	109,100,000

研究分野：神経発生学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：ニワトリ胚、網膜視蓋投射、視蓋、EphrinA2, EphrinA5, Fgf8, En2,, エレクトロポレーション

1. 研究開始当初の背景

カエルの目を 180 度回転して移植すると、そのカエルは左に餌があると右の方に舌を伸ばし、前にあるときはむしろ餌が後の方にあるという行動を取ることから、このカエルの視蓋では 180 度回転した像が結ばれている

と結論づけ、Sperry は化学親和仮説を唱えた。そこで、網膜、視蓋で勾配を持って発現している分子の探索が行われ、Ephrin A2, A5 が視蓋の後ろの方で強く、前の方で弱いという勾配を持って発現しており、その受容体の EphA3 が網膜の耳側で強く、鼻側で弱いとい

う勾配をもって発現していることが明らかにされた。EphA3 を発現している耳側網膜線維は EphrinA2/A5 によって反発され、視蓋後ろに侵入することはできない。EphA3 の発現量によってどこで反発されるかが決まるので、それにより前後軸に沿った投射マップが作られる。

中脳後脳境界部（峽部）からは Fgf8 が分泌され、オーガナイザーとして働く。Fgf8 は Ras-ERK シグナル経路を活性化して小脳を誘導するが、その Ras-ERK シグナル経路と視蓋の軸形成に特に焦点をあてた。

2. 研究の目的

鳥類以下の中脳視蓋は視覚の中枢であり、網膜から位置特異的な投射を受ける。網膜は実験的操作を加えやすいので、網膜視蓋投射系は神経回路形成研究のモデルシステムとして使われ、Ephrin-Eph システムなどの発見につながった。一方鳥類視蓋は 16 層よりなるが、その層構築のメカニズムについては詳細な解析がまだなされていない。本研究では網膜視蓋投射系研究のための視神経のラベル法の開発、峽部オーガナイザーシグナルと視蓋の前後軸形成機構、視蓋層形成機構について解析を行った。

3. 研究の方法

遺伝子の導入は E1.5 ニワトリ胚にエレクトロポレーションにより行った。E1.5 にエレクトロポレーションを行い、トランスポゾンを利用して、GFP, RFP をゲノムに取り込ませる方法により視神経線維をラベルした。

4. 研究成果

(1) 新しい視神経線維のラベル法の開発による新しい網膜視蓋投射経路の発見

まず、視神経線維のラベル法を開発した。メダカのトランスポゾン Tol2 を採用することにより、エレクトロポレーションにより導入したトランスジーンをゲノムに組み込み、安定的に長期の発現を得ることができるようになった。そこで、発生初期の眼胞に Tol2 プラスミドにトレーサー cDNA (lacZ, GFP, RFP) を組み込み、トランスポゾナーゼ発現プラスミドと一緒にエレクトロポレーションを行って、トレーサー DNA をゲノムに組み込み、視神経線維をラベルした。この方法では網膜の大きな領域をラベルして、視神経の全体としての振る舞いを観察したり、小部分をラベルして、局所的な対応を観察することもできる。図 1 は E1.5 (孵卵 1.5 日) に網膜耳側に GFP を鼻側に RFP をエレクトロポレーション

して、網膜の大部分をラベルしたものである。E15.5 に固定すると (図 1)、ゲノムに組み込まれた GFP, RFP 遺伝子の安定的発現が見られ、網膜の腹側で耳側と鼻側に特異的に GFP と RFP の発現が見られた。視蓋ではその背側で、前側に GFP の、後ろ側に RFP の強い蛍光が見られる。(原田英斉による結果)

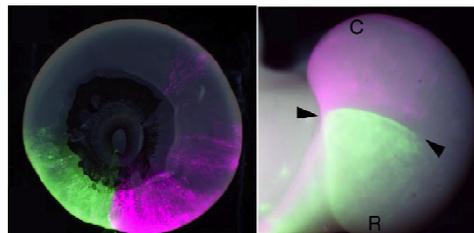


図 1

視神経線維は視神経交叉で交叉後、視索を通過して、吻側から視蓋に侵入するが、視蓋では表層(SO, Stratum Opticum)を走り、標的近くで 90 度ターンして視蓋の表層で SGFS (Stratum Griseum et Fibrosum Superficiale) の b, c, d, f 層でシナプスを作る。g 層より深層に侵入することはないとされている。新しいラベル法で視神経をラベルし、その走行を調べると、最初から視蓋の SAC (Stratum Album Centrale) を走る繊維群が見つかった。現在その繊維の起始、停止と生物学的意義について解析をすすめている。(尾身実による結果)

(2) 峽部オーガナイザーシグナルと視蓋軸形成

中脳後脳境界部（峽部）は中脳後脳のオーガナイザーとして働き、中脳胞に視蓋を後脳胞に小脳を誘導する⁷。オーガナイザーとして最も大きな働きをするのが Fgf8 で、強い Fgf8 シグナルにより、Ras-ERK 経路が活性化されると小脳が誘導される⁸。後脳領域では活性化された ERK はすぐに脱リン酸化されるが、中脳胞では ERK の活性が後ろで強く前で弱いという勾配を持っている。そこで、この ERK の活性化勾配が視蓋の前後軸決定に重要な役割を果たしているという仮定の下に実験を行った。

Fgf8 を強制発現すると ERK が活性化され、視蓋は後方化する。即ち本来視蓋後に投射する網膜鼻側からの線維が視蓋の前側に投射

する。ドミナントネガティブ型 Ras (DN-Ras)により ERK の活性を抑えると、視蓋が前方化し、耳側網膜線維が視蓋のより後側で投射するようになる。これまで、En2 の発現勾配（後で強く、前で弱い）により、EphrinA2, A5 の発現勾配が形成され、網膜線維はその勾配を読むことによって、前後軸に沿った投射が決まると考えられてきた。そこで、En2 を強制発現したところ、En2 の発現細胞ではむしろ *EphrinA2* の発現は抑制され、その周りで誘導されていた。*EphrinA2/A5* の細胞非自律的な誘導は、En2 により *Fgf8* と *Fgf18* が誘導され、ERK が活性化することによる。また、En2 は *Fgf8* を細胞自律的に誘導する。*Fgf8* は峽部において、細胞自律的に *Sprouty2* を誘導し、*Fgf8* 発現領域で ERK の活性化をネガティブフィードバックにより抑制する。このことから、En2 強制発現による *EphrinA2*, *EphrinA5* の抑制は En2 によって誘導された *Sprouty2* による細胞自律的抑制が原因であると考えられた。そこで、En2 と *Sprouty2* のドミナントネガティブ変異体を共導入したところ、*EphrinA2* の細胞自律的抑制がキャンセルされた。しかしながら、*EphrinA5* は依然として抑制されていた。

これらの結果から、*EphrinA2* は *Fgf8*-Ras-ERK 経路に依存して発現するが、*EphrinA5* は Ras-ERK 経路以外の *Fgf* シグナル経路に依存的であると考えられた。従来の説どおり En2 が *EphrinA2/A5* の誘導に必要かどうかを再度検証する為に、siRNA による機能阻害実験を行った。すると、細胞自律的に *EphrinA2/A5* の発現が抑制された。これらの結果をまとめると、*EphrinA2* の誘導には *Fgf*-Ras-ERK 経路の活性化と En が協調的に働くことが必要であること、また、*EphrinA5* は Ras-ERK 経路以外の *Fgf* シグナルと En2 が協調的に働くことが必要であることが明らかになった。以上により、それぞれ異なる *Fgf* シグナル経路と En2 が協調的に働くことによって *EphrinA2* と *EphrinA5* が誘導され、視蓋の極性が決まると考えられる。

ERK の下流で働く分子として、*Pea3/Ets* (*Pea3*, *Erm*, *Er81*)に着目し研究を進めた。まず、*Pea3/Ets* の発現を調べると、*Pea3* と *Erm* が中脳胞と後脳胞で発現しており、*Fgf8* を強制発現するとその発現が誘導され、ドミナントネガティブ型 Ras (DN-Ras)の強制発現により抑制されることから、*Pea3*, *Erm* の発現は *Fgf8*-Ras-ERK 経路により制御されていることが分かった。

そこで、*Pea3/Erm* 共通にドミナントネガティブとして働くと考えられるコンストラク

ト (DN-*Pea3*)を stage 9 のニワトリ胚に強制発現したところ、*Shh* の発現が中脳後脳域で異所的に誘導された。中脳腹側に形成される動眼神経ニューロンと思われる神経細胞が中脳背側にも認められた。

以上の結果は *Fgf* シグナルが *EphrinA2*, *EphrinA5* の発現を誘導して中脳の前後軸の決定に関わるとともに、*Shh* シグナルと相互作用することにより、背腹軸の形成にも関わっていることを示している。なお、背腹軸形成における *Fgf* シグナルと *Shh* シグナルのクロストークは中脳胞のみならず、神経管全域に及んでいるようである。(原田英斉による結果)

(3) 視蓋の層形成の解析

ニワトリの視蓋は最終的に 16 層の層構造を持ち、各々の層は各々の役割を持っている。しかしながら、視蓋の層形成のメカニズムについては、あまり分かっていない。そこで視蓋で層特異的に発現している *ER81* に着目した。*ER81* は *Ets/Pea3* サブファミリーに属する転写因子で、鳥類視蓋、大脳皮質で層特異的に発現しているが、機能についてはあまり分かっていない。まず、*ER81* の詳細な発現パターンを調べ、次に、*ER81* をエレクトロポレーション法によりニワトリ胚に強制発現した。In situ hybridization によると、*ER81* の発現は 7 日目のニワトリ胚の視蓋の i 層で開始し、16 日目では *ER81* の発現は視蓋の第 v~vii 層に観察された。次に、*ER81* をエレクトロポレーション法により、遺伝子導入した。*ER81* の長期的発現を得るために、トランスポゾンベクターを用いて、*ER81* をゲノムに組み込ませた。in ovo だと血管にダメージを与えるため、エレクトロポレーションは E3 に卵殻外培養を行い、E6 胚にエレクトロポレーションを行ったこれらの実験の結果、*ER81* 強制発現細胞は主に第 v~vii 層に見られたことから *ER81* は神経細胞の特定の層への移動に関与する可能性があることが示唆された。現在ドミナントネガティブ型の *ER81* を作成して解析をすすめている。(田中順による結果)

(4) 結語

網膜視蓋投射が正確に行われるためには、視蓋の領域かが的確に行われ、視蓋内での極性が的確に決定されないといけない。峽部オーガナイザーにより、視蓋、小脳が決定される。オーガナイザーシグナルである *Fgf8* は Ras-ERK シグナル経路を活性化するが、その ERK の活性化の勾配により視蓋の前後極性が

決定される。ERK の下流で働くと考えられる Pea3/Ets サブファミリーのうち、Erm は視蓋背側から、Shh シグナルを抑制して、視蓋の背腹軸の決定にも関わっていることを明らかにした。Ets サブファミリーに属する ER81 は視蓋層特異的に発現しており、現在その役割の解析をさらにすすめている。このように、峡部オーガナイザーは視蓋の前後軸、背腹軸の決定に深く関わってい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 21 件) 全て査読あり

- 1, Omi M, Harada H, Nakamura H. Identification of retinotectal projection pathway in the deep tectal laminae in the chick. *J Comp Neurol* 2011 doi:10.1002/cne.22642
- 2, Suzuki-Hirano A, Harada H, Sato T, Nakamura H, Activation of Ras-ERK pathway by Fgf8 and its downregulation by Sprouty2 for the isthmus organizing activity *Dev Biol* 337, 284-293 (2010)
- 3, Hou X, Katahira T, Kimura J, Nakamura H, Expression of chick Coactosin in cells in morphogenetic *Dev Growth Differ* 51, 833-840 (2009)
- 4, Aoki M, Kiyonari H, Nakamura H, Okamoto H, R-spondin2 expression in the apical ectodermal ridge is essential for outgrowth and patterning in mouse limb development. *Dev Growth Differ* 50, 85-95 (2008)
- 5, Nakamura H, Sato T, Suzuki-Hirano A, Isthmus organizer for mesencephalon and metencephalon. *Dev Growth Differ* 50, S113-118 (2008)
- 6, Odani N, Ito K, Nakamura H, Electroporation as an efficient method of gene transfer. *Dev Growth Differ* 50, 443-448 (2008)
- 7, Harada H, Takahashi Y, Kawakami K, Ogura T, Nakamura H, Tracing retinal fiber trajectory with a method of transposon-mediated genomic

integration in chick embryo. *Dev Growth Differ* 50, 697-702 (2008)

- 8, Aoki M, Mieda M, Ikeda T, Hamada Y, Nakamura H, Okamoto H, R-spondin3 is required for mouse placental development. *Dev Biol* 301, 218-26 (2007)
 - 9, Odani N, Pfaff SL, Nakamura H, Funahashi J, Cloning and developmental expression of a chick G-protein-coupled receptor SCGPR1. *Gene Exp Pat* 7, 375-80 (2007)
 - 10, Sakuragi M, Sasai N, Ikeya M, Kawada M, Onai T, Katahira T, Nakamura H, Sasai Y, Functional analysis of chick ONT1 reveals distinguishable activities among olfactomedin-related signaling factors. *Mech Devel* 123, 114-23 (2006)
 - 11, Matsunaga E, Nakamura H, Chédotal A, Repulsive guidance molecule plays multiple roles in neuronal differentiation and axon guidance. *J Neurosci* 26, 6082-8 (2006)
 - 12, Suzuki-Hirano A, Sato T, Nakamura H, Regulation of isthmus Fgf8 signal by sprouty2. *Development* 132, 257-65 (2005)
 - 13, Nakamura H, Watanabe Y, Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon. *Int J Dev Biol* 49, 231-5 (2005)
 - 14, Toyoda R, Nakamura H, Watanabe Y, Identification of protogenin, a novel immunoglobulin superfamily gene expressed during early chick embryogenesis. *Gene Exp Pat* 5, 778-85 (2005)
 - 15, Nakamura H, Katahira T, Matsunaga E, Sato T, Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development. *Brain research. Brain Res Rev* 49, 120-6 (2005)
- [学会発表] (計 23 件)
- 1, Harukazu Nakamura Organizing signal for development of the tectum and cerebellum. UCL-Tohoku University Symposium, From Cell/Developmental Biology to Neuroscience.

organizers: Harukazu Nakamura & Shin-ichi Ohnuma, 15 March 2010, London

2, Minoru Omi, Hidekiyo Harada, Harukazu Nakamura: Transient innervation of retinal axons to the deeper laminae prior to establishment of the lamina-specific projection in chick optic tectum. 16th International Society of Developmental Biologists Congress, Edinburgh. 6-10 September 2009, UK

3, Hidekiyo Harada, Tatsuya Sato, Harukazu Nakamura: Coordination of midbrain A-P and D-V axis formation by mutual-repression of FGF and SHH signaling. 16th International Society of Developmental Biologists Congress, Edinburgh. 6-10 September 2009, UK

4, 仲村春和「脳的设计図とその書き換えによる自在な脳の作り替え」第2回 東北大学バイオフィオーラム ～ 脳科学の革新的な発展を目指して～ 2009年6月5日、東京ステーションコンファランス

5, Harada, H., Nakamura, H.: Fgf signaling in tectal polarity formation . Godon Conference 'Fibroblast Growth Factors in Development & Disease' 2-7 March, 2008, Il Ciocco, Italy

6, Suzuki-Hirano, A., Sato, T., Nakamura, H.: Regulation of ERK phosphorylation for the MHB formation and cerebellar development . Gordon Conference 'Fibroblast Growth Factors in Development & Disease' 2-7 March, 2008, Il Ciocco, Italy

7, Suzuki A., Sato T. & Nakamura, H. (2008) Regulation of the Fgf8-Ras-ERK signaling pathway for cerebellar development. ZAO Conference, The 1st International Conference of Tohoku Neuroscience GCOE, "from GENES to DEVELOPMENT and BEHAVIOR", Miyagi Zao Royal Hotel, 23-24 Jan 2008.

8, Harada, H. Tanaka, J. Matsuda, Y. Suzuki-Hirano, A. Nakamura, H. : Fgf signaling and En2 for tectal polarity formation . ZAO Conference, The 1st International Conference of Tohoku Neuroscience GCOE, "from GENES to DEVELOPMENT and BEHAVIOR", Miyagi Zao Royal Hotel, 23-24 Jan 2008.

9, Hou X. Katahira T. Kimura J. Nakamura H. : Analysis of coactosin, an actin binding protein, in neural crest cell migration. ZAO Conference, The 1st International Conference of Tohoku Neuroscience GCOE, "from GENES to DEVELOPMENT and BEHAVIOR", Miyagi Zao Royal Hotel, 23-24 Jan 2008.

10, Ito, K. Toyoda, R. Nakamura, H. Watanabe, Y.: Protogenin (PRTG) is involved in gastrulation cell movement . ZAO Conference, The 1st International Conference of Tohoku Neuroscience GCOE, "from GENES to DEVELOPMENT and BEHAVIOR", Miyagi Zao Royal Hotel, 23-24 Jan 2008.

11, Tanaka, J., Harada, H., Nakamura, H.: Analysis of EphrinA2/A5 expression in the optic tectum . ZAO Conference, The 1st International Conference of Tohoku Neuroscience GCOE, "from GENES to DEVELOPMENT and BEHAVIOR", Miyagi Zao Royal Hotel, 23-24 Jan 2008.

12, Harada, H., Matsuda, Y., Tanaka, J., Suzuki-Hirano, A., Nakamura, H. : Establishment of anteroposterior axis of the chick optic tectum by Fgf-Ras-ERK signaling. International Chick Meeting, 11-14 April, 2007, Barcelona, Spain.

13, Hou, X., Katahira, T., Kimura, J. , Nakamura, H.: Analysis of coactosin, an actin binding protein, in neural crest cell migration. International Chick Meeting, 11-14 April, 2007, Barcelona, Spain.

14, Suzuki-Hirano, A., Sato, T. , Nakamura, H.: Sequential regulations of ERK signaling activity and cerebellar development. International Chick Meeting, 11-14 April, 2007, Barcelona, Spain.

15, 仲村春和「脳を組み立てる」生命科学研究所シンポジウム「脳と社会」一東北大学脳研究者プラットフォーム 2006年11月13日、仙台市

16, Suzuki-Hirano, A, Sato, T. and Nakamura, H. : Regulation of Fgf8 signaling for the cerebellar development: Special attention paid to ERK activity level. Neuroscience 2006. 14-18 October. 2006. Atlanta.

17, Harada, H, Sato, T. and Nakamura, H.: Pea3/Ets transcription factors as downstream factors of Fgf8-Ras-Erk signaling around the isthmus organizer. Neuroscience 2006. 14-18 October. (15 October) 2006. Atlanta.

18, Harada, H., Sato, T., Hirate, Y., Okamoto, H. and Nakamura, H.: Expression of Canopy2 in the optic tectum and its involvement in cell proliferation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 18-23 June 2006. Kyoto.

19, Suzuki-Hirano, A., Sato, T. and Nakamura, H.: Analysis of Ras-ERK signaling pathway for the cerebellar development. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 18-23 June (23 June) 2006. Kyoto.

20, Sato, T., & Nakamura, H. Regulation of Ras-ERK signaling pathway for cerebellar development. Gordon Conference: Fibroblast Growth Factors in Development & Disease. Organizers: Olwin B. B., Ornitz, D. M. 12-17 March, 2006 Ventura, CA, USA

21. Katahira, T., Kimura, J. Watanabe, Y. and Nakamura, H.: Hes5 expression and rostrocaudal polarity formation of the tectum. 35nd Annual Meeting of Society for Neuroscience. 12-16 November. (15 November) 2005. Washington, DC.

22, Nakamura, H., Sato, T., Suzuki, A.: Isthmus organizing signal for the tectum and cerebellar development. 2nd International Symposium and annual meeting of Dynamics of Developmental System, Nov. 3-6, 2005, Kisarazu, Chiba

23, Harukazu Nakamura: Regionalization and laminar formation of the optic tectum in relation to retinotectal projection map. Symposium 'Formation, Development and Function of Neural Circuit' Organizer M. Kano & T. Manabe, The 28th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 26-28 July, 2005, Yokohama

[図書] (計 2 件)

1, 仲村春和 (編集), Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology 全 331 頁 シュプリンガー・ジャパン (2009)

2, 仲村春和, 加齢医学 pp164-176 東北大学出版会, (2007)

[産業財産権]

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/molneu/ro/Dept_Mol_Neurobiol/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲村 春和 (NAKAMURA HARUKAZU)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号 : 90079690

(2) 研究分担者

舟橋 淳一 (FUNAHASHI JUN-ICHI)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号 : 00270827

渡邊 裕二 (WATANABE YUJI)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号 : 80301042

尾身 実 (OMI MINORU)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号 : 00400416

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :