

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19700313
 研究課題名（和文）
 サブタイプ特異的な樹状突起形態の形成における LIMホメオボックス遺伝子の役割
 研究課題名（英文）
 LIM-homeobox transcription factors regulate neuronal dendritic morphogenesis in subtype-specific manner.
 研究代表者
 須賀 晶子 (Suga Akiko)
 独立行政法人理化学研究所・網膜再生医療研究チーム・研究員
 研究者番号：70450400

研究成果の概要（和文）：

神経発生において、前駆細胞での転写因子の発現は神経細胞の運命決定に重要であるが、より後期の現象に転写因子が果たす役割はそれほど分かっていない。本研究では網膜神経細胞のサブタイプ特異的な形態形成に注目し、LIM-ホメオドメイン型転写因子である *Lim1* と *Islet1* がトリ網膜の水平細胞でサブタイプ特異的に発現する事、サブタイプそのものの維持と細胞形態の形成に重要なことを見出した。また神経細胞のサブタイプが発生後期でも変化しうることを示した。

研究成果の概要（英文）：

In nervous system, transcription factor expression in progenitor cells regulates cell type specification. However, whether or not these transcription factors regulate later developmental events remains an open question. We found that two LIM-homeodomain transcription factors, *Lim1* and *Islet1*, are expressed in distinct subtype of retinal horizontal cells (*Lim1*: type I, *Islet1*: type II/III). Overexpression of *Islet1* in post-migratory horizontal cells repressed endogenous *Lim1* expression and increased the cells with type II cell specific morphology. Inhibition of *Lim1* function perturbed axonal morphogenesis of type I horizontal cells. Our results suggest that LIM-homeodomain transcription factors are required for subtype-specific morphogenesis of horizontal cells at later stages of retinal development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1400000	0	1400000
2008年度	700000	210000	910000
2009年度	800000	240000	1040000
総計	2900000	450000	3350000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・神経科学一般

キーワード：網膜、神経発生、ニワトリ胚、サブタイプ、樹状突起形態、転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経組織が正しく機能するには、組織を

構成する神経細胞一つ一つが適切な形態をとり、軸索と樹状突起を介したネットワークを作り上

げることが必要である。軸索の伸長と投射パターンに関わる因子が盛んに研究されてきたのに対し、神経細胞のサブタイプによって多様な形をとる樹状突起の形成は、複雑な形の詳細を生体内で観察する技術の困難さもあり、主にショウジョウバエを用いた研究成果が報告されている状況だった。

(2) 網膜の6種類の神経細胞が分化する時期とそれを制御する転写因子群は詳しく分かっていたが、さらに細かいサブタイプがいつ決定されるのか、また一度方向づけられたサブタイプが変化することがあるのかどうかは分かっていた。

(3) われわれの研究室ではニワトリ網膜の水平細胞が形態的に3種類に区別されること、軸索を持つ細胞(タイプI)と持たない細胞(タイプII、タイプIII)で、それぞれLIM-ホメオドメイン型転写因子に含まれるLim1とIslet1が発現していることを見出していた。網膜の2次ニューロン、3次ニューロンである両極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞はそれぞれ10から20種類のサブタイプがあるが、これらに比べると水平細胞はサブタイプの数少なく、形態的な区別が明瞭なのでモデルとして用いやすいと考えられた。

(4) Lim1とIslet1はそれぞれ発生初期の神経組織の形成と、脊髄の運動神経細胞の分化に重要なことがよく知られている。特に脊髄から四肢に投射する運動神経細胞では、二つの転写因子が相互抑制的に神経細胞の細胞体の位置と軸索の投射パターンを制御することから、網膜の水平細胞でもLim1とIslet1が細胞の運命決定と細胞形態を制御する可能性が考えられた。

(5) 網膜神経細胞の発生研究では、特に神経細胞が分化した後に時期特異的に遺伝子発現を調節するのは困難である。われわれの研究室ではTol2トランスポゾンとTET応答性の遺伝子発現法を組み合わせ、エレクトロポレーション法により目的遺伝子を細胞内に導入した後にテトラサイクリン投与によって時期特異的に導入遺伝子の発現を調節する方法をに作成していた。

(6)

2. 研究の目的

サブタイプを形態的に明瞭に区別できるニワトリ網膜の水平細胞をモデルとし、転写因子Lim1とIslet1が、サブタイプ分化とサブタイプ特異的な樹状突起形態の形成にどのような働きをしているのかを明らかにする。

(1) 網膜水平細胞は、前駆細胞から細胞周期を脱したのちに神経性網膜組織内を遊走して水平細胞層を形成し、その後神経突起を伸展して

各サブタイプに特異的な樹状突起形態を作り上げる。まずLim1とIslet1が水平細胞が分化するどの時期に働いているのかを明確にするために、それぞれの遺伝子の発現パターンを詳細に調べる。

(2) 水平細胞の樹状突起が形成される時期特異的にLim1又はIslet1の過剰発現と機能阻害実験を行い、それぞれの転写因子が神経細胞の形態形成にどのような役割を持っているのかを解析する。

(3) 脊髄運動神経ではLim1とIslet1は異なるサブグループで発現し、お互いの発現を抑制することが知られている。水平細胞のサブタイプの確立でも同様に、相互抑制的な遺伝子発現の制御が行われているのかどうかを調べる。

3. 研究の方法

(1) Lim1とIslet1が水平細胞の発生のどの時期に関わっているか詳細に知るために、免疫組織化学によりそれぞれのタンパク質の発現パターンを調べた。

(2) 胚発生のニワトリ網膜を用いた通常の遺伝子導入実験では、遺伝子発現が長期的に維持できない、遺伝子の発現時期を調節できないという欠点があった。本研究では、Lim1とIslet1の機能を神経細胞が樹状突起を形成する時期特異的に解析するために、トランスポゾンを用いて外来遺伝子をゲノムに組み込ませる方法と、外来遺伝子の発現を時期特異的に調節できるTetシステムを組み合わせ用いた(図1)。

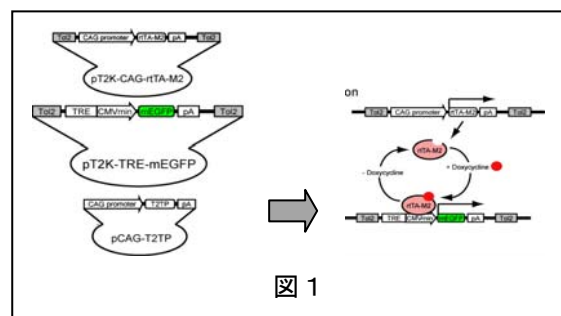


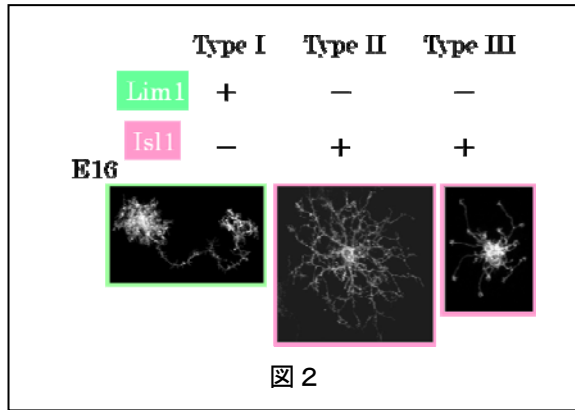
図1

(3) GFPとLim1又はIslet1を共発現させたニワトリ胚網膜組織をwhole-mount抗体染色し、GFPでラベルされた細胞の軸索および樹状突起形態を定量的にあらわした(長さ・末端の受容野の広さ)。3種類の水平細胞の形が遺伝子の過剰発現・機能阻害で変化するかどうかを定量的に検討した。

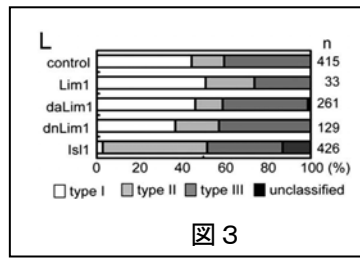
4. 研究成果

(1) Lim1とIslet1はそれぞれ水平細胞が神経前駆細胞から分化した直後から発現していた。

水平細胞が網膜組織内を水平細胞層へ移動する間、水平細胞層で樹状突起を形成する間を通して Lim1 と Islet1 の発現は重ならず、水平細胞には Lim1 発現細胞と Islet1 発現細胞の二つの異なる細胞群があることが示された。より後期の Lim1 と Islet1 の発現は、軸策を持つタイプ I 水平細胞と軸策を持たないタイプ II、タイプ III 水平細胞に対応していた (図 2)。



(2) 水平細胞の分化・水平細胞層への移動が終了した時期に、薬剤投与によって外来の Islet1 遺伝子を過剰発現させると、軸策を持つタイプ I 細胞の割合が大きく減少した。外来の Islet1 によって内在性の Lim1 の発現は抑制されており、さらに軸策を持たないタイプ II、タイプ III 細胞のマーカー遺伝子は正常に発現していたことから、Islet1 の過剰発現はタイプ I 水平細胞をタイプ II/III 水平細胞に変化させたと考えられた。水平細胞のサブタイプは、前駆細胞が最終分裂を終える直前にある程度決まっているという報告がなされていたが、本研究結果は、一度方向づけられた水平細胞のサブタイプが外来遺伝子の過剰発現によって、神経発生の後期でも変換しうることを示した (図 3、4)。

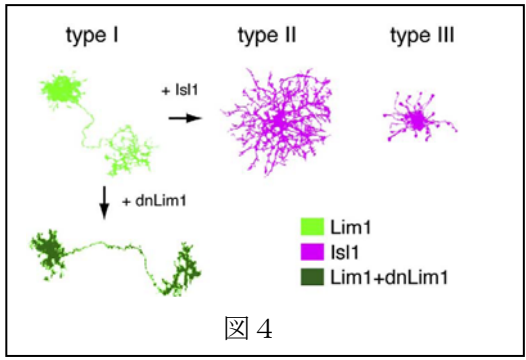


一方で、Lim1 の過剰発現では各サブタイプの割合に変化は見られず、Islet1 の発現も抑制されなかった (図 3)。これらの結果から、網膜の水平細胞のサブタイプは、脊髄運動神経とは異なる機構で維持されていると考えられた。

(3) Islet1 が水平細胞のサブタイプそのものを変換したのに対し、Lim1 は軸策を持つ細胞の軸策形態を制御していた。ドミナントネガティブ因子により Lim1 の機能を阻害すると、タイプ I 細胞の軸策が有意に長くなり、逆に軸策末端の広がり小さくなる傾向が見られた。タイプ I 細胞の軸策末端は桿体視細胞とシナプスを形成しており、Lim1 は軸策長を制御することでタイプ I 水平細胞が機能する範囲を調節している

と考えられた。

(4) 以上の結果から、転写因子 Lim1 はタイプ I 水平細胞がシナプスを作る範囲を調節するのに必要であり、Islet1 はタイプ II 水平細胞の特異性を決めるのに重要な因子であると考えられた (図 4)。



(5) 本研究では、Lim1 と Islet1 という二つの転写因子が水平細胞の軸策形態とサブタイプ分化のそれぞれに重要なことを示した。特に Islet1 の過剰発現でサブタイプ間の変換が起きたことは、神経細胞が少なくともサブタイプのレベルでは細胞分化の後期でも可塑性を持つ可能性を示している。網膜を構成する 6 種類の神経細胞のうち、2 次ニューロンである両極細胞とアマクリン細胞、3 次ニューロンである神経節細胞はそれぞれ細胞形態から 10 から 20 のサブタイプに分類される。発生過程におけるそれぞれのサブタイプの決定に重要な転写因子は徐々に分かってくるが、それらが神経細胞の発生後期に、特に一度方向づけられた分化運命の維持にどのような役割を果たしているのかはまだ研究が進んでいない。神経組織が機能するうえで重要と考えられる細胞運命の決定とその可塑性がどのように制御されているのか、一度でき上がった成体の神経細胞においても外部からの遺伝子導入によって細胞のアイデンティティを変えることができるのかは今後の興味深い課題である。

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 2 件)

1) LIM family transcription factors regulate the subtype-specific morphogenesis of retinal horizontal cells at post-migratory stages
Akiko Suga, Masanori Taira, and Shinichi Nakagawa *Developmental Biology*

330(2009) 318-28

(査読あり)

須賀晶子、高橋政代
網膜再生と Wnt シグナル
医学のあゆみ (印刷中) (査読なし)

[学会発表] (計 2 件)

Screening for the genes regulating neurite extension
in the chick retina

須賀晶子
第 2 回フロンティア研究システム研究成果発表
会

平成 19 年 5 月 17 日 (木)、18 日 (金)
理化学研究所

網膜水平細胞の形態形成における、サブタイプ
特異的な転写因子の機能解析

須賀晶子 中川真一

第 30 回日本分子生物学会年会 一般口頭発表
パシフィコ横浜 2007 年 12 月 11 日～15 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須賀 晶子 (Suga Akiko)

独立行政法人理化学研究所・網膜再生医療研究

チーム・研究員

研究者番号：70450400

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者