

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770199
 研究課題名（和文）脊椎動物の眼発生に必須の転写因子 Rax の機能制御機構の解析
 研究課題名（英文）Analysis of functional regulation of Rax which is essential for eye development in vertebrates

研究代表者
 寺田 晃士 (TERADA KOJI)
 (財)大阪バイオサイエンス研究所・発生生物学部門・研究員
 研究者番号：70342722

研究成果の概要：眼の神経網膜は、未分化な細胞が繰り返し増殖し、視覚機能を発揮するのに十分な細胞数に達すると増殖を停止し、神経細胞のネットワークが構築され、完成する。しかし、細胞数を適切に調節する機構は明らかにされていない。本研究では、多様なタンパク質の活性を制御することの知られている Ubc9 が、Rax に制御される因子 HMGB3 と協調して、網膜の未分化な細胞の増殖を調節することを新しく見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

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：形態形成、Rax、HMGB3、Ubc9、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

眼は外界の情報を取り入れ脳に情報を伝達する、動物の活動に非常に重要な役割をもつ感覚器のひとつである。脊椎動物の眼は、神経板の前方の eye field(予定眼領域)と呼ばれる領域から発生する。予定眼領域に発現

する転写因子として、Pax6、Six3、Six6、Rax(Rx)などが知られている。これらの因子は、眼胞においても継続的に発現が認められることから、神経板上での予定眼領域の獲得、その後の眼の発生において重要な役割をもつことが予想されるが、実際に、それらの欠

損動物の表現型、機能阻害実験などにより、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル、ニワトリ、マウス、ヒトなどにおいて眼の発生に必須、あるいは重要な役割をもつことが示されている。各転写因子の機能阻害実験による知見が蓄積され、一方で、それらの因子の組み合わせにより異所的な眼の形成が引き起こされることが報告されるなど、それら因子が眼の形成に重要な役割をもつという考えは、広く受け入れられている。

予定眼領域に発現する転写因子 Rax は、ペアータイプホメオボックスタンパク質である。ノックアウトマウスの解析から、Rax は眼胞の形成に必須であることが示されている。Pax6 の変異マウスも眼が形成されないが、眼胞がいったん出来た後に発生が止まることが報告されている。また、Rax のノックアウトマウスでは *pax6*、*six3* などの発現が認められないが、*pax6* の変異マウスでは *rax* の発現が認められることから、Rax は眼発生の最上流に位置する因子のひとつであると考えられる。このことより、Rax の下流因子の探索は、予定眼領域から眼が発生する分子機構の解明につながると期待された。

2. 研究の目的

眼の初期発生の分子機構の解明。主に、神経板における眼領域の決定機構と、網膜前駆細胞の増殖機構、増殖停止機構、それぞれにおける分子機構の解析。眼発生の最も初期の兆候は、神経板での **eye field** の決定である。したがって、**eye field** を決定する仕組みが、眼発生を制御する最も初期の機構であると考えられた。また、中枢神経系の正常な構築には適切な細胞数、多様な神経細胞が必要である。神経細胞は発生中における増殖停止の時期に依存した運命決定がなされる。そのため、細胞増殖、細胞増殖停止の調節機構は、正常な中枢神経系の構築に非常に重要であると

考えられた。

3. 研究の方法

実験系には主にアフリカツメガエルの系を用い、発生中の網膜における網膜幹・未分化前駆細胞の増殖機構、増殖停止機構を解析した。遺伝子の発現を whole mount in situ ハイブリダイゼーションや section in situ ハイブリダイゼーション法により詳細に解析した。表現型解析には、具体的には、4-8 細胞期のアフリカツメガエル胚に合成 RNA を注入して注目するタンパク質を大量発現させ、眼の大きさ、形などの表現型を解析し、増殖の状態を解析した。また、注目するタンパク質の機能阻害実験を、単独、あるいは組み合わせで行い、同様に眼の表現型を解析して、遺伝子間の、発生のプロセスにおける相互作用を解析した。

4. 研究成果

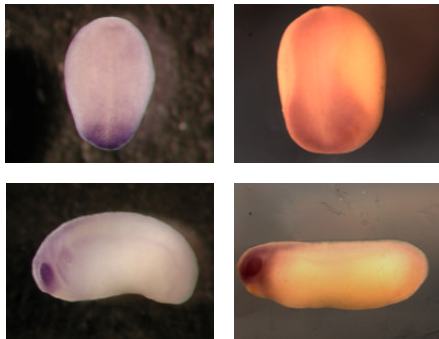
我々は以前、眼発生の分子機構の解明を目的として Rax により誘導される因子を探索し、Xenopus high mobility group B3 (xhmg3) を単離して、xhmg3 がアフリカツメガエルにおいて、神経前駆細胞、網膜前駆細胞の増殖を促進することを見出した。xhmg3 は非ヒストン型のクロマチンタンパク質であり、DNA の構造変化の誘導、転写因子の活性化などの機能をもつことが知られている。我々はさらに、xhmg3 が細胞増殖を促進する分子機構の解明を目的として xhmg3 と結合する因子を探索し、Ubiquitin conjugating enzyme 9 (Ubc9) を単離した。Ubc9 はユビキチンではなく、small ubiquitin-related modifier (SUMO) の結合酵素として知られ、また、脊椎動物で現在までに知られている唯一の SUMO 結合酵素であり、タンパク質の SUMO 化に必須であることが知られている。SUMO 修飾を受けたタンパク質は、細胞内における局在の変

化、アロステリックな構造変化、活性の変化などが報告されており、近年、細胞機能における SUMO 修飾の重要性が強く認識されてきている。本研究では、主に xhmg3 と Ubc9 の眼発生における関係について解析した。



xhmg3 の構造。201 アミノ酸。HMG ドメイン A、B は DNA 結合ドメイン。DNA 配列の特異性は認められていない。Acidic region は、酸性アミノ酸残基の豊富な領域。転写活性化、あるいは転写抑制化ドメインは認められず、知られた酵素活性をもつドメインも認められない。そのため、他のタンパク質と共に機能する可能性が考えられた。

(1) まず、xhmg3 と Ubc9 の発現を解析し、両者が発生期の眼において一緒に機能する可能性があるのかどうか、検討した。



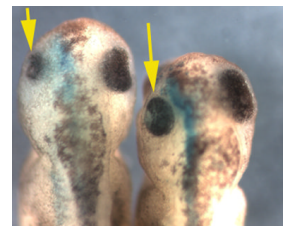
whole mount in situ ハイブリダイゼーション法により、発生中(上段：ステージ 15、下段：ステージ 25)のアフリカツメガエル胚における xhmg3 と Ubc9 の発現を比較した。左側は xhmg3、右側は Ubc9 の発現を検出した embryo。上段は、embryo を背側から撮影。下向きに前方、上側に後方が来る。下段は embryo を横から撮影。左側が頭部で、右側が尾部。紫色のシグナルが、xhmg3、あるいは Ubc9 の発現を示す。



アフリカツメガエルの眼の section を用いた section in situ ハイブリダイゼーション法により、xhmg3 と Ubc9 の発現を検討した。左は xhmg3 のステージ 41 における発現。網膜幹細胞が存在する ciliary marginal zone (CMZ) に発現が認められる。右は、Ubc9 のステージ 41 における発現。xhmg3 と同様に CMZ に発現が認められた。黄色の矢印は CMZ を示す。矢印の示す付近の紫色は遺伝子の発現を示す。

その結果、xhmg3 と Ubc9 は同様の時期に同様の場所に発現が認められ、眼の発生において、共に機能する可能性が示唆された。

(2) 次に、Ubc9 がアフリカツメガエルにおいて、眼発生に重要であるかどうかを、Ubc9 の酵素活性ドメインの変異体(高発現によりドミナントネガティブ変異体として機能する)を用いて検討した。



アフリカツメガエルに Ubc9 の変異体を発現させた。ステージ 37/38 で解析。青色のシグナルは遺伝子の導入を示す。導入された方では、導入されていない方と比較して、眼の大きさが小さくなっている(黄色の矢印で示されている)。

この結果から、Ubc9 の活性は、眼の発生において重要な役割をもつことが示された。

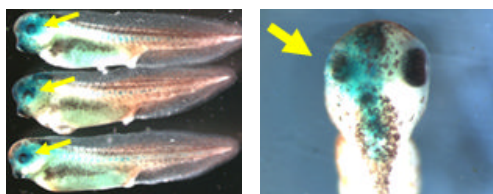
(3) 我々は、次に、xhmg3 と Ubc9 が眼発生において機能的に相互作用があるのかどうか、アフリカツメガエルにおける xhmg3 と Ubc9 の大量発現を試みて、検討した。



上の写真は、Xhmg3 と Ubc9 をアフリカツメガエル胚に大量発現させ、ステージ 37/38 で背側から頭部を撮影したもの。青色のシグナルは、遺伝子導入の領域を示す。この embryo では、向かって左側に導入されている。

その結果、xhmg3 と Ubc9 の導入により、眼の巨大化が引き起こされた。このことより、xhmg3 と Ubc9 は眼の初期発生において、協調的に機能することが強く示唆された。

(4) 次に、内在性の xhmg3 と Ubc9 が機能的相互作用を示すかどうか、機能阻害実験により検討した。



xhmg3 と Ubc9 を同時に阻害した。遺伝子機能を阻害をしたほうの眼が縮小した。青色は遺伝子機能を阻害した領域を示す。黄色の矢印は、縮小した眼を示す。

その結果、xhmg3 と Ubc9 を同時に阻害した時に、眼の縮小が認められた。xhmg3、あるいは Ubc9 だけを阻害したときに影響のほとんど出ない強さで阻害した。この結果より、xhmg3 と Ubc9 はアフリカツメガエルにおいて、眼発生に協調して機能することが示された。

(5) 以上より、xhmg3 と Ubc9 は眼発生において重要な役割をもつことが示された。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

①寺田 晃士、網膜幹細胞の増殖、維持に必須の役割を有する SUMO 結合酵素 Ubc9 の解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド

②Koji Terada, An essential role of Ubc9, a SUMO conjugating enzyme, in retinal stem cell proliferation, The Second International Conference on Ocular Cell Biology, September 2-5, 2008, Paradise Point Resort and Conference Center, San Diego, California

③寺田 晃士、網膜幹細胞の増殖における SUMO 結合酵素 Ubc9 の役割、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月 12, 13 日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 晃士 (TERADA KOJI)

(財) 大阪バイオサイエンス研究所・発生生物学部門・研究員

研究者番号：70342722