

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790057
 研究課題名（和文） GABA 及びドパミン作動性ニューロンの発生機構における FGF19 の役割の解明
 研究課題名（英文） The roles of Fgf19 in development of GABAergic interneurons and dopaminergic neurons.
 研究代表者
 三宅 歩 (MIYAKE AYUMI)
 京都大学・薬学研究科・講師
 研究者番号：40346044

研究成果の概要：

Fgf19 シグナルは Fgf 受容体 1 と Fgf 受容体 4 を介して MAPK 経路を活性化することにより網膜の前後軸の特性決定を調節していることが明らかになった。また、終脳の形成過程における Fgf19 の機能は Fgf 受容体 1 あるいは Fgf 受容体 2 を介して発揮され、間脳の形成過程における Fgf19 の機能は Fgf 受容体 1、Fgf 受容体 2 あるいは Fgf 受容体 4 を介して発揮される可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|----------|-----------|---------|-----------|
| 平成 19 年度 | 1,700,000 | 0 | 1,700,000 |
| 平成 20 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 480,000 | 3,780,000 |

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：FGF、ゼブラフィッシュ、脳・神経形成、眼形成

1. 研究開始当初の背景

FGF family としては現在 22 種類の FGF が human/mouse で同定されており、このうち Fgf3 や Fgf8 は初期の脳形成過程において重要な役割を果たしている。Human FGF19 と mouse Fgf19 も胎生期の脳に発現している。しかし、Fgf19 KO mice が胎生 12.5 日目までに死亡するため、マウスを用いた脳形成過程における Fgf19 の機能解明は困難である。そこで、神経外胚葉選択的に機能阻害が行える zebrafish に着目して、zebrafish Fgf19 を同定し、24 時間胚の脳に発現していることを見出した。さらに、Fgf19 の機能を阻害した

zebrafish 胚の解析から Fgf19 が脳発生過程の初期において神経上皮細胞の増殖と生存維持に関与しており、終脳及び間脳形成過程においてはその領域の特性決定に必要であることを明らかにした。また、前脳形成に関与している Hh シグナル及び Fgf3、Fgf8 シグナルと Fgf19 との関係を検討し、Fgf19 の前脳における発現は Hh シグナルによって制御されており、Fgf3、Fgf8 シグナルの制御は受けていないことも明らかにした。さらに、Fgf19 は前脳において Hh シグナル伝達経路の下流で dlx2 の発現を制御することにより、GABA 作動性ニューロンとオリゴデンドロサ

イトの分化に関与していることも明らかにした。Fgf3 および Fgf8 も前脳における GABA 作動性ニューロンとオリゴデンドロサイトの分化に必要なであったが、Fgf19 の方がより必要性が高いことも示した。また、Fgf19 がドパミン (DA) 作動性ニューロンの分化に関与している可能性を示唆する知見も得ている。Zebrafish Fgf19 は水晶体と網膜にも発現しており、水晶体形成過程において Fgf19 が水晶体線維細胞の分化に関与していることを明らかにしている。さらに、Fgf19 機能阻害胚において網膜の形態異常も認められた。従って、Fgf19 は網膜神経細胞の分化にも重要な役割を果たすことが期待される。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュ胚の眼において Fgf19 は受精後 14 時間の眼胞全体に発現しているが、受精後 18 時間までに網膜の鼻側 (nasal retina) に発現が限局し、神経分化が開始する受精後 24 時間以降では網膜の内側の領域に発現していることから、Fgf19 が脳においてと同様に網膜神経細胞の分化にも関与している可能性が考えられる。また、22 種類存在する Fgf リガンドは、各々 4 種類の Fgf 受容体に対してそれぞれ異なる親和性をもつことが知られている。ヒト FGF19 は、同定された当時は FGF 受容体 4 に特異的に結合することが報告されていた。しかし近年、Fgf 受容体の補助因子として β Klotho が発見され、Fgf19 が β Klotho を介して Fgf 受容体 1 や Fgf 受容体 2 にも結合することが報告され、Fgf19 シグナルの作用メカニズムは複雑である。そこで本研究では、網膜神経細胞の分化における Fgf19 の機能と眼形成過程における Fgf19 の標的受容体及び Fgf19 によって活性化される細胞内シグナル伝達経路の解明を試みた。

また、脳形成過程において Fgf19 が介する Fgf 受容体の同定についても試みた。

3. 研究の方法

(1) 網膜神経分化における Fgf19 の機能解析

Fgf19 の網膜神経細胞の分化に対する影響を検討するため、網膜神経分化の初期に誘導される neurod と *is11* の発現パターンを WISH 法により検討した。さらに、神経細胞特異的に発現する RNA 結合タンパク質 HuC/D に対する抗体を用いて免疫染色を行い、網膜神経分化の後期における Fgf19 の役割についても検討した。また、眼組織切片を作製して網膜神経の層構造に対する Fgf19 の影響についても検討した。

(2) 眼形成過程における Fgf19 の標的受容

体および Fgf19 により活性化される細胞内シグナル伝達経路の検討

Fgf 受容体 1-Fgf 受容体 4 の 4 種類の Fgf 受容体遺伝子の眼における発現パターンについて検討した。さらに、Fgf 受容体 1 および Fgf 受容体 4 の 2 種類の Fgf 受容体遺伝子の眼形成における機能について検討した。2 種の Fgf 受容体遺伝子に対して 2 種類ずつ MO を設計し機能阻害実験を行った。Fgf 受容体 1 と Fgf 受容体 4 の機能阻害胚の網膜における表現型が Fgf19 阻害胚の網膜における表現型と一致しているか検討するため、*ephrin A3* の発現パターンを解析した。

Fgfr はチロシンキナーゼ型受容体であり、その下流の代表的な細胞内シグナル伝達経路としては MAPK 経路が知られている。そこで、Fgf19 がこの MAPK 経路を活性化することにより脳形成に関与しているか検討するため、Fgf19 機能阻害胚の前脳において MAPK 経路が活性化されているか否か検討した。指標として MAPK 経路の構成因子である ERK1/2 のリン酸化について抗体を用いて検出した。

(3) 脳形成過程における Fgf19 の標的受容体の検討

Fgf 受容体 1-Fgf 受容体 4 の 4 種類の Fgf 受容体遺伝子の前脳における発現パターンについて検討した。さらに、Fgf 受容体 1、Fgf 受容体 2 および Fgf 受容体 4 の 3 種類の Fgf 受容体遺伝子の前脳形成における機能について検討した。3 種の Fgf 受容体遺伝子に対して 2 種類ずつ MO を設計し機能阻害実験を行い、前脳における表現型を検討した。

4. 研究成果

(1) 網膜神経分化における Fgf19 の機能解析

Fgf19 の網膜神経細胞の分化に対する影響を検討するため、網膜神経分化の初期に誘導される neurod と *is11* の発現パターンを解析した結果、受精後 45 時間での neurod と受精後 48 時間での *is11* 遺伝子は Fgf19 機能阻害胚で正常に発現していた。そこで、神経細胞特異的に発現する RNA 結合タンパク質 HuC/D の発現パターンを解析し、網膜神経分化の後期における Fgf19 の役割についても検討した。その結果、受精後 5 日の Fgf19 機能阻害胚において HuC/D 陽性細胞はコントロール胚と同様に網膜の内側に存在する網膜神経節細胞とアマクリン細胞に検出され、後期の網膜神経分化も正常であった。さらに、網膜神経の層構造に対する Fgf19 の影響を検討したところ、受精後 3 日の Fgf19 機能阻害胚の背側における網膜神経の層構造は正常であった。また、受精後 3 日の Fgf19 機能阻害胚の腹側においては網膜神経の層構造に異常がみられ

たが、これは Fgf19 機能阻害胚の腹側における眼裂の融合異常によるものと考えられる。これまでに、網膜の形成過程において Fgf19 が網膜の鼻側領域に特異的に発現し、網膜の鼻側-耳側軸の特性決定に関与していることを明らかにしているが、本研究により Fgf19 は網膜神経細胞の神経分化には関与していないことが示唆された。

(2) 眼形成過程における Fgf19 の標的受容体および Fgf19 により活性化される細胞内シグナル伝達経路の検討

ゼブラフィッシュ Fgf 受容体遺伝子はこれまでに Fgf 受容体 1~Fgf 受容体 4 の 4 種類が同定されている。このうち Fgf 受容体 1 が受精後 18 時間と 24 時間に、Fgf 受容体 4 が受精後 24 時間に網膜において発現していた。そこで、Fgf 受容体 1 および Fgf 受容体 4 の 2 種類の Fgf 受容体遺伝子の眼形成における機能について検討した。2 種の Fgf 受容体遺伝子に対して 2 種類ずつ MO を設計し機能阻害実験を行った。まず MO が標的遺伝子の機能を選択的に阻害することを確認するため、正常胚及び機能阻害胚から total RNA を抽出し、RT-PCR により標的遺伝子 mRNA の検出を行った結果、今回用いた Fgf 受容体 MO が各 Fgf 受容体遺伝子の機能の特異的に阻害していることが確認された。さらに、それぞれの Fgf 受容体遺伝子に対する MO1 導入胚と MO2 導入胚の表現型を解析した結果、互いにその表現型が類似しており、いずれも網膜の形成異常を示した。そこで、Fgf 受容体 1 と Fgf 受容体 4 の機能阻害胚の網膜における表現型が Fgf19 阻害胚の網膜における表現型と一致しているか検討するため、ephrin A3 の発現パターンを解析した。その結果、Fgf 受容体 1 と Fgf 受容体 4 の機能阻害胚で網膜前方における ephrin A3 の発現が大きく減少しており、Fgf19 は Fgf 受容体 1 と Fgf 受容体 4 を介して網膜の鼻側-耳側軸の特性決定に関与していることが明らかになった。

さらに、Fgf19 がこの MAPK 経路を活性化することにより網膜形成に関与しているか検討するため、Fgf19 機能阻害胚の網膜において MAPK 経路が活性化されているか否か検討した。その結果、受精後 22 時間の正常胚では網膜前方で MAPK 経路が活性化していることが明らかになった。一方、Fgf19 機能阻害胚についても検討を行ったところ、網膜前方における MAPK 経路の活性化が消失していた。従って、Fgf19 シグナルは Fgf 受容体 1 と Fgf 受容体 4 を介して MAPK 経路を活性化することにより網膜の前後軸の特性決定を調節していることが明らかになった。

(3) 脳形成過程における Fgf19 の標的受容体の検討

脳形成過程において Fgf19 が介する Fgf 受容体を同定するため、脳形成過程における Fgf 受容体の発現及び機能について検討した。受精後 24 時間で Fgf 受容体 3 は前脳領域において発現していないが、Fgf 受容体 1 は終脳および間脳に広く発現し、Fgf 受容体 2 は終脳腹側および間脳の前脳領域、Fgf 受容体 4 は終脳腹側において発現することが報告されている。しかしながら、その他の発生段階における詳細な発現解析は行われていない。そこで、Fgf19 の発現が開始する受精後 12 時間と受精後 18 時間における Fgf 受容体遺伝子の発現解析を行なった。その結果、Fgf 受容体 1 は 12 時間胚から前脳領域に発現し、18 時間胚では前脳領域で高発現していた。Fgf 受容体 2 は 12 時間胚では前脳領域全体に弱く発現しており、18 時間胚では前脳領域で高発現していた。Fgf 受容体 4 の発現は 12 時間胚の前脳領域には認められなかったが、18 時間胚の間脳においてはその発現が認められた。

そこで、Fgf 受容体 1、Fgf 受容体 2、Fgf 受容体 4 の 3 種類の Fgf 受容体遺伝子の前脳形成における機能について検討した。Fgf 受容体 2 遺伝子に対しても 2 種類の MO を設計し機能阻害実験を行った。それぞれの Fgf 受容体遺伝子に対する MO1 導入胚と MO2 導入胚の表現型を解析した結果、互いにその表現型が類似しており、いずれも前脳の形成異常を示した。これらの結果は、Fgf 受容体 1、Fgf 受容体 2 および Fgf 受容体 4 が前脳の形成に必須であることを示している。

従って、受精後 18 時間のゼブラフィッシュ胚の終脳においては Fgf 受容体 1、Fgf 受容体 2 のみが発現しており、それぞれの遺伝子の機能阻害胚を解析した結果と総合的に判断すると、終脳の形成過程における Fgf19 の機能は Fgf 受容体 1 あるいは Fgf 受容体 2 を介して発揮していると考えられる。また、受精後 18 時間のゼブラフィッシュ胚の間脳においては Fgf 受容体 1、Fgf 受容体 2、Fgf 受容体 4 の 3 種類の受容体が発現しており、それぞれの遺伝子の機能阻害胚を解析した結果と総合的に判断すると、間脳の形成過程における Fgf19 の機能は Fgf 受容体 1、Fgf 受容体 2 あるいは Fgf 受容体 4 を介して発揮していると考えられる。

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 4 件)

1. S. Mizumoto, T. Mikami, D. Yasunaga, N. Kobayashi, H. Yamauchi, A. Miyake, N. Itoh, H. Kitagawa, K. Sugahara.

“Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 is required for somitic muscle development and motor axon guidance in zebrafish.”
Biochem. J., 419, 387-399, 2009 査読あり

2. Y. Nakayama, A. Miyake, Y. Nakagawa, T. Mido, M. Yoshikawa, M. Konishi, N. Itoh.
“Fgf19 is required for zebrafish lens and retina development.”
Dev. Biol., 313, 752-756, 2008 査読あり

3. I. Kimura, Y. Nakayama, H. Yamauchi, M. Konishi, A. Miyake, M. Mori, M. Ohta, N. Itoh, M. Fujimoto.
“Neurotrophic activity of neudesin, a novel extracellular heme-binding protein, is dependent on the binding of heme to its cytochrome b5-like heme/steroid-binding domain.”
J. Biol. Chem., 238, 4323-4331, 2008 査読あり

4. T. Wakahara, N. Kusu, H. Yamauchi, I. Kimura, M. Konishi, A. Miyake, N. Itoh.
“fibin, a novel secreted lateral plate mesoderm signal, is essential for pectoral fin bud initiation in zebrafish.”
Dev. Biol., 303, 527-535, 2007 査読あり

[学会発表] (計 1件)

1. A. Miyake, N. Itoh.
“Fgf19 is required for zebrafish lens and retina development”
The XVIII International Congress for Eye Research
2008.9.27 Beijing, China

6. 研究組織

(1)研究代表者

三宅 歩 (MIYAKE AYUMI)
京都大学・薬学研究科・講師
研究者番号 40346044

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し