

機関番号：63904

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500299

研究課題名 (和文) 網膜内領域特異化の分子機構の解明

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms for regional specification in the retina

研究代表者

作田 拓 (SAKUTA HIRAKI)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・助教

研究者番号：40343743

研究成果の概要 (和文)：

CBF2 が網膜内で転写抑制因子として機能し、CBF1、GH6、SOHo1、ephrin-A5 を負に EphA3 を正に制御していることが明らかにした。GH6 と SOHo1 が CBF2 の発現を抑制することも判明した。また CBF1 の場合と異なり、CBF2 には BMP シグナルを阻害する活性がないことも明らかにした。さらに眼胞前側の Fgf シグナルと後側の Wnt シグナルによって、CBF1 と CBF2 の領域特異的発現が決定されていることも明らかにした。以上の結果とこれまでの研究成果を合わせて、網膜内領域特異化の遺伝子カスケードの全容を解明することに成功した。

研究成果の概要 (英文)：

Misexpression of CBF2 represses the expression of CBF1, GH6, SOHo1, and ephrin-A5, and induces that of EphA3 in the retina. GH6 and SOHo1 repress the expression of CBF2. In contrast to the inhibitory effect of CBF1 on bone morphogenic protein (BMP) signaling, CBF2 does not alter the expression of BMP4 or BMP2. Studies with chimeric mutants of CBF2 showed that CBF2 acts as a transcription repressor in controlling its downstream targets in the retina. Furthermore, Fgf and Wnt first play pivotal roles in inducing the region-specific expression of CBF1 and CBF2 in the optic vesicle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経発生学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：網膜視蓋投射、CBF2、領域特異化、網膜、ニワトリ

1. 研究開始当初の背景

我々は脳における神経結合様式の1つである領域特異的投射の分子機構を解明すべく、ニワトリの網膜視蓋投射系を用いて研究を行ってきた。網膜視蓋投射の分子機構は、発生期網膜内領域特異化の分子機構と不可分の関係にあると考え、まず、Restriction

Landmark cDNA Scanning (RLCS)法等を用いて、ニワトリ網膜の前後(鼻耳)軸および背腹軸において領域特異的(勾配をなし)に発現する分子の大規模スクリーニングを行い、53個の領域特異的分子の同定に成功した(Shintani et al., J. Neurobiol., 2004)。この中には多くの転写調節因子、膜分子、分

泌因子、シグナル伝達因子、細胞骨格関連因子、等が存在していた。これらの遺伝子の発現過程における発現を解析したところ、網膜の発生期(E2-E6)に発現のピークを示すものと、視神経が視中枢に到達した後(E8以降)にピークを示すものに大別された。以後、現在に至るまで E2-E6 に発現ピークを示す分子群を中心に、それらの機能と相互関係を明らかにする研究を行ってきた。

これらの分子中の winged-helix 型転写因子 chick brain factor1 (CBF1) および CBF2 は、ニワトリ網膜において、それぞれ鼻側、耳側で領域特異的に発現する。レトロウイルスを用いた異所的発現実験から、これら2つの転写因子はそれぞれ網膜の鼻側、耳側の視神経の投射先を制御することを明らかにしていたが、その作用機序については永らく不明のままであった。そこで、in ovo electroporation 法による CBF1 のニワトリ網膜内での異所的発現実験を行い、網膜内で前後軸方向の投射に関与することが知られるすべての分子の発現が、CBF1 により制御されることを明らかにした(Takahashi et al., Development, 2003)。さらに、その多様な制御機構も判明した(図 1)。しかしその一方で、CBF2 による網膜耳側の領域特異化の制御機構については、依然として不明のままである。

背腹軸においては、我々は新規 BMP 中和分子 Ventroptin を発見し、BMP4 と Ventroptin のペアによって背腹軸方向における領域特異性が決定することを世界に先駆けて明らかにした(Sakuta et al., Science, 2001)。次に BMP4 から BMP2 へのスイッチングが起こり、背腹軸方向における領域特異化に関わる分子群の発現維持が BMP2 と Ventroptin のペアに引き継がれること(Sakuta et al., Science, 2001; Takahashi et al., Development, 2003)、このとき背腹軸の後方への傾斜が起こることを発見した(Sakuta et al., J. Neurosci., 2006)。また、この背腹軸の傾斜は CBF1 の BMP シグナル阻害活性によることも明らかにした(Takahashi et al., Development, 2003)。その結果、網膜視蓋投射は、従来考えられていたように垂直な2つの軸方向に独立に決定されるのではなく、両軸方向に相互作用する複雑な関係にあることが明らかとなった。

網膜視蓋投射マップは網膜内領域特異化、軸索ガイダンス、軸索分枝形成、神経回路リファインメントといった過程を経て完成する。上記の研究から網膜内領域特異化・軸索ガイダンスといった網膜視蓋投射マップ形成の前半過程の分子機構について、CBF2 による網膜耳側領域特異化機構を除き、その全貌を解明することに成功した。これらの成果をまとめたものは「Encyclopedia of Neuroscience」誌上で発表されることとなっ

ており、世界的に高く評価された(Noda et al., Encycl. Neurosci., 2008)。

2. 研究の目的

本研究は、網膜耳側で発現する CBF2 による領域特異化の分子機構の解明を目的とする。本研究は、我々が明らかにした CBF1 による網膜内領域特異化の分子機構の解明と対をなすものであり、網膜視蓋投射マップ形成の前半過程の分子機構を完全に理解する上で必要不可欠なものである。

3. 研究の方法

①網膜鼻側のマスター遺伝子 CBF1 の多様な制御機構を明らかにしているが(Takahashi et al., Development, 2003; 図 1)、CBF2 についても同様な解析を行った。CBF2 を組み込んだレトロウイルスベクターを用いて、in ovo electroporation 法により CBF2 をニワトリ胚網膜に異所的に強制発現させ、CBF1、SOHo1、GH6、ephrin-A2、ephrin-A5、EphA3 といった前後軸方向における領域特異化や網膜視蓋投射に関与する領域特異的遺伝子の発現パターンの変化を in situ hybridization によって解析した。前後軸方向に領域特異的発現を示す分子だけでなく、Ventroptin や BMP2 といった背腹軸の傾斜を担う分子への影響も調べることによって、CBF2 の背腹軸傾斜への関与の可能性も検討した。

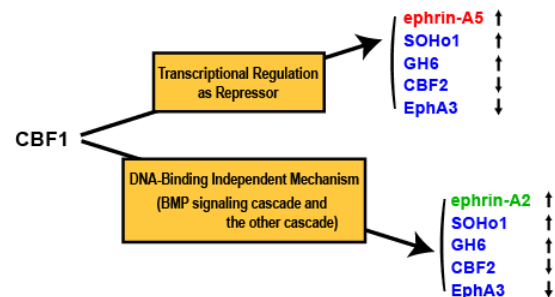


図 1 CBF1 による下流遺伝子の発現制御機構

CBF1 による下流遺伝子の発現制御機構はそれぞれ異なっており、ephrin-A5 は DNA 結合依存的な機構によって、ephrin-A2 は DNA 結合非依存的な機構によって、SOHo1、GH6、CBF2、EphA3 については2つの制御機構のどちらによっても制御される。これら2つの経路のどちらでも、1セットの Eph-ephrin システムの発現が維持される。

②CBF2 のホモログでは、マウス BF2 が転写の活性化因子として、一方、アフリカツメガエル XBF2 は転写の抑制因子として働くことが報告されている。近年、複数の転写因子につ

いて活性化、抑制化両面の機能を持って働く例が報告されている。我々は CBF2 についても両方の機能を持っていることを示唆するデータを、培養細胞を用いた系で得ている(未発表)。そこで網膜における CBF2 の作用機構について、CBF2 と Even-skipped の転写抑制ドメインをつないだ抑制型コンストラクト、CBF2 と VP16 の転写活性化ドメインをつないだ転写活性化型コンストラクト等を用いて下流遺伝子に対する作用を野生型 CBF2 と比較検討した。さらに CBF2 の一部を欠損させたコンストラクトを作製し、その機能ドメインを同定した。

③ CBF1 が転写因子として DNA 結合依存的な機構でばかりではなく、DNA 結合非依存的機構で下流遺伝子の発現を制御していることを明らかにしている(Takahashi et al., Development, 2003)。CBF2 も同様に DNA 結合非依存的機構で下流遺伝子を制御していることが考えられる。そこで DNA 結合に必須のアミノ酸残基を置換した CBF2 の変異型コンストラクトを作製して網膜に遺伝子導入し、野生型の CBF2 を異所的に発現させた場合と下流遺伝子の変化を比較検討した。

④ CBF1 が BMP シグナル抑制活性を持ち、これによって BMP2 と Ventroptin が本来の背腹軸に対して後方に傾斜して発現することを明らかにしているが(Takahashi et al., Development, 2003)、CBF2 も同様に BMP シグナルを調節することが考えられる。我々はすでに培養細胞を用いた BMP シグナル測定系を開発しており、この系を用いて CBF2 の BMP シグナルへの影響を検討した。また BMP シグナルによって BMP 自身の発現が正に制御されることが知られている。そこで in ovo electroporation 法により CBF2 をニワトリ胚網膜に強制発現させ、このときの BMP シグナルの制御下にある分子の発現を調べることで、CBF2 の BMP シグナル調整能を検討した。

⑤ CBF1、CBF2 の網膜内における発現パターンを規定する因子は、これまで明らかにならなかったが、他の脳領域と同様に Fgf、Wnt、Shh 等の分泌性モルフォゲンによって決定されると考えられる。我々は Fgf8、Wnt1、Wnt3a および Shh が発生初期眼胞およびその周辺組織において発現していることを見出している。そこで in ovo electroporation 法により、これらの分子を強制発現させ、CBF1 と CBF2 の発現パターンの変化を調べることで、CBF1、CBF2 の網膜内における発現パターンを規定する分子を同定した。

4. 研究成果

レトロウイルス粒子を用いた遺伝子導入では、CBF2 の発現量は低く、導入可能時期が遅すぎるといった問題点があった。本年度、レ

トロウイルスベクターをエレクトロポレーションで導入することにより、発生の早い時期から CBF2 を発現させ、かつ発現量を増加させることに成功した。この結果、CBF2 の強制発現により、CBF1、GH6、SOHo1、ephrin-A5 の発現が減少し、EphA3 の発現が誘導されることが明らかになった。GH6 と SOHo1 が CBF2 の発現を抑制することも判明した。さらに CBF1 の強制発現の場合とは異なり、CBF2 の強制発現は ephrin-A2 の発現に影響しないことも明らかとなった。以上の結果と CBF2 の転写抑制型コンストラクトや転写活性化型コンストラクトを網膜に導入した結果を比較したところ、CBF2 が網膜内で転写抑制因子として機能し、CBF1、GH6、SOHo1、ephrin-A5、EphA3 といった遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。また CBF1 の場合と異なり、CBF2 には BMP シグナルを阻害する活性がないことも明らかにした。さらに眼胞前側の Fgf シグナルと後側の Wnt シグナルによって、CBF1 と CBF2 の領域特異的発現が決定されていることも明らかにした。以上の結果とこれまでの研究成果を合わせて、前後軸方向の網膜内領域特異化の遺伝子カスケードの全容を解明することに成功した(図 2)。

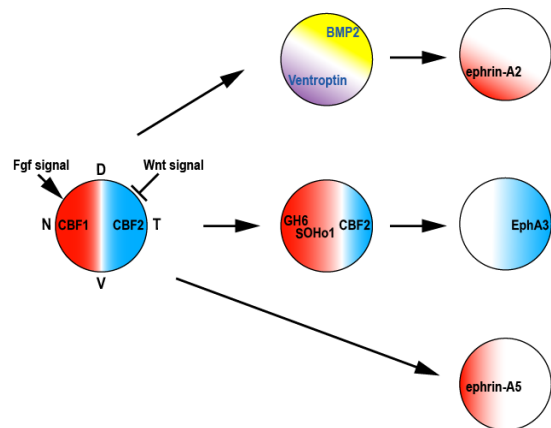


図 2 前後軸方向の網膜内領域特異化の遺伝子カスケード

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 3 件)

- ① Takahashi, H., Sakuta, H., Shintani, T., and Noda, M. (2009) Functional mode of FoxD1/CBF2 for the establishment of temporal retinal specificity in the developing chick retina. Dev Biol 331, 300-310, 査読有
- ② Yonehara, K., Ishikane, H., Sakuta, H.,

Shintani, T., Nakamura-Yonehara, K., Kamiya, N. L., Usui, S., and Noda, M. (2009) Identification of retinal ganglion cells and their projections involved in central transmission of information about upward and downward image motion. PLoS ONE 4, e4320, 査読有

- ③ Sakuta, H., Suzuki, R., and Noda, M. (2008) Retroviral vector-mediated gene transfer into the chick optic vesicle by in ovo electroporation. Dev Growth Differ 50, 453-457, 査読無

[学会発表] (計1件)

- ① 米原圭祐、新谷隆史、鈴木亮子、作田拓、竹内靖、中村・米原佳世、石金浩史、Nilton L. Kamiya、臼井支朗、野田昌晴 SPIG1の発現により明らかになった ON 中心型方向選択性神経節細胞サブタイプの発達様式 2008年 第31回日本神経科学大会 東京 7月

[図書] (計2件)

- ① Sakuta, H., Suzuki, R., and Noda, M. (2009) Retroviral vector-mediated gene transfer into the chick optic vesicle by in ovo electroporation. In Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology (H. Nakamura, ed.) pp. 105-116. Springer, Springer-Verlag, 査読無
- ② Noda, M., Takahashi, H., and Sakuta, H. (2009) Neural Patterning: Eye fields. In Encyclopedia of Neuroscience 4th ed. (L. M. Squire et al., eds.) pp. 199-204. Elsevier B. V., Amsterdam, 査読有

[その他]

ホームページ等

所属機関ホームページ

<http://www.nibb.ac.jp/>

所属研究室ホームページ

<http://niwww3.nibb.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

作田 拓 (SAKUTA HIRAKI)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・助教

研究者番号：40343743