

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570199

研究課題名（和文）網膜視蓋投射・視蓋層形成機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of retinotectal projection and tectal layer formation

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）：視神経繊維の大部分は視蓋の表層を走り、標的付近で内側に向きを変えシナプスを作るが、本研究により、最初から視蓋の深層を走る一過性の一群があることが明らかにされた。En2は視蓋の発生初期に後ろとしての位置価を与えるが、視神経が視蓋に到達した頃に、SGFS, g-j層で発現している。En2の強制発現により、En2発現細胞は視蓋の浅層に到達することはなかった。E1.5にEn2をトランスフェクトし、Doxによりその発現をE8.5に誘導すると、浅層でEn2を発現した細胞はi層に戻っていった。このことから、En2が視蓋総計性に深く関わっていることが示唆された。Neuropilin1（NRP1）がE8.5視蓋のIV、V層に、そのリガンドSema3AがVI層に発現している。IV、V層の細胞は接戦方向の移動をする細胞により構成されることが本研究により明らかとなった。その接戦方向の移動にSema-Neuropilinの反発系が関与していることが示唆された。Sema3Aを強制発現すると視蓋の層構造が乱れることから、semaphorin-neuropilinの反発系が視蓋の総計性に大きな役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have shown that some part of the optic fibers run deep layers of the tectum from the first. These fibers are transient and disappear after birth. En2 is expressed in laminae g-j of SGFS in tecta of around E10. Misexpression of En2 showed that En2 expressing cells cannot stay in the superficial layers of the tectum. Time lapse analysis showed that En2 expressing cells went out of the superficial layer and settled in lamina i. The results indicate that En2 plays crucial roles in tectal layer formation. We found that layer IV, and V are composed of cells that have migrated tangentially, and that neuropilin1 is expressed in layer IV, V cells and sema3A is expressed in layer VI cells. Sema3A overexpression resulted in abnormal layer formation of the tectum. The results indicate that neuropilin-Semaphorin repulsive system plays crucial roles in tectal layer formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：網膜視蓋投射、視蓋層形成、ニワトリ胚、エレクトロポレーション、Engrailed

### 1. 研究開始当初の背景

網膜視蓋投射系はそのアプローチのしやすさから、神経回路形成のモデルとして使われてきた。研究代表者らは、視蓋の位置特異性形成に *Engrailed2* (*En2*) が関わっており、*En2* は視蓋に後ろとしての性質を付与することを明らかにした。網膜視蓋投射システムでの解析から、軸索の経路選択に働く *Ephrin-Eph* のリガンド-受容体の系が発見されたが、*En2* は *EphrinA2, A5* の発現を誘導する。一方、*En2* は直接鼻側網膜を吸引する作用があることが *in vitro* で示されていた。ニワトリ視蓋は 16 層よりなる皮質構造を示すが、研究代表者らの解析により、早期に移動した細胞の間に後から移動した細胞群が入り込むことが明らかにされていた。哺乳動物の大脳皮質の層構築のメカニズムがかなり明らかになってきたのと比較してその解析は遅れている。

### 2. 研究の目的

本研究は網膜視蓋投射のメカニズムおよび視蓋の層構築のメカニズムを解明することを目的としている。視神経線維は視蓋に進入後視蓋の表層を走り、標的付近で直角に向きを変え投射する。一方、予備実験で最初から視蓋の深層を走る線維が見つかったので、その詳細を明らかにするとともに、視蓋の層構築に関して、*Ets* ファミリーの *Pea3* サブファミリーに属する *Er81* 転写因子、*Sema-neuropilin* 系あるいは他の分子の役割を調べ、層構築のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

視神経線維のラベルは脂溶性蛍光色素 DiI の結晶を網膜におくことにより行う。候補となる分子の cDNA に tetracyclin 反応配列 (TRE) をつけ、それをトランスポゾン用のプラスミドに組み込む (pT2K-TRE-cDNA)。このプラスミドと pT2K-CAGGS-rtTA, pCAGGS-T2TP (トランスポザーゼ発現プラスミド) をニワトリ胚視蓋原基にエレクトロポレーションしてトランスフェクトする。目的遺伝子と rtTA はトランスフェクトした細胞のゲノムに組み込まれる。rtTA タンパク質は tetracyclin (Doxycyclin, Dox で代用) が存在するときのみ TRE に結合し、目的遺伝子の転写が起こる。

### 4. 研究成果

最初から視蓋深層を走る線維は視蓋の内側から進入し深層を外側に向かう。それらの線維は視蓋の Stratum album centrale と

Stratum fibrosum periventriculare を走行し、大多数の視神経線維が走っている Stratum opticum にはいることはない。これらの線維は一過的なもので、孵化する頃にはほとんど見えなくなっている。

*Er81* の発現を詳細に調べたところ、後期移動細胞がつくる視蓋 SGFS の h-j 層に発現していることがわかった。この *Er81* の発現と重複して Parvalbumin が発現している。*Er81* を強制発現すると、*Er* 発現細胞で Parvalbumin が発現したことから、*Er81* は後期移動細胞の細胞種の決定に大きな役割を果たし、層形成に関与していることが示唆された。一連の研究で正常発生ニワトリ胚では *Er81* の mRNA の発現は孵卵 7.5 日 (E7.5) から見られたが、*Er81* のタンパク質の発現はその抗体染色によると E9.5 からしか認められないことが明らかとなった。E6.5 に *Er81* 発現プラスミドをエレクトロポレーションし、E7.5 でその発現をみると、*Er81* タンパク質を発現している細胞は神経上皮に局在し、外套層に移動している細胞はほとんど見られなかった。このことは神経上皮内で *Er81* を発現すると外套層への移動が阻害される可能性があることを示唆しており、*Er81* は目的地に着く前にそのタンパク質が発現しないよう翻訳制御を受けていると考えられる。

*En2* は視蓋の発生初期 (E2) に、視蓋原基に後ろとしての性質を付与する。さらに *En2* は分泌されて直接鼻側網膜線維を引きつけることが *in vitro* で示された。網膜視蓋投射形成中の E10 で *En2* は視蓋の SGFS, g-j 層に発現しているため、*in vivo* でもそのような機能があるかどうかを調べる目的で E5.5 に *En2* をエレクトロポレーションによりトランスフェクトした。*En2* 発現細胞は視蓋の表層には存在しなかったことから、網膜線維の経路選択における役割の追求は難しく、視蓋層形成における役割を追求することとした。E5.5 に *En2* をトランスフェクトし、組織学的検索を行うと、*En2* 発現細胞は本来 *En2* を発現している SGFS, g 層よりも深層にしか見られず、浅層には見られなかった。GFP のみをトランスフェクトした細胞は視蓋全層に見られた。そこで、pT2K-TRE-*En2*, pT2K-CAGGS-rtTA, pCAGGS-T2TP を E1.5 に同時にトランスフェクトした。*En2* は Dox 投与 3 時間くらいで発現する。Dox 投与により E8.5 から *En2* を発現させ、経時的に観察すると、Dox 投与 12 時間後には *En2* 発現細胞は視蓋浅層にも見られたが、24 時間後には浅層から *En2* 発現細胞は消え、g 層よりも深層にしか

見られなかった。動画撮影により観察すると、Dox 投与直後に浅層に見られた En2 発現細胞は深層にバックしていく様子が見られた。コントロールでは深層に行く細胞は見られなかった。統計を取ると、En2 発現細胞は SGFS, i 層に戻っていつているという結果が得られた。これらのことより、En2 は視蓋の成熟期に、SGFS, g-j 層で発現し、視蓋神経細胞をその層に移動させつなぎ止める役割を果たしていると考えられる。

受容体 Neuropilin1 (NRP1) が E8.5 視蓋の IV, V 層に発現しており、そのリガンド Sema3A が VI 層に発現している。IV, V 層の細胞は接戦方向に移動してくる細胞群で構成されることが、タイムラプス解析により明らかとなった。またこれらの細胞は MAP2 を発現するようになる。Sema3A を強制発現すると MAP2 発現細胞層の異常が起こることから、Sema3A 発現細胞群が NRP1 発現細胞群をガイドし、MAP2 発現細胞層の形成に関わっていることが示された。このことにより、Sema3A-NRP1 のリガンド-受容体のシステムが視蓋の層形成に大きな役割を果たしていることが明らかとなった。

ニワトリ視蓋は 16 層よりなり、その層形成メカニズムの解明は遅れているが、本研究により En2 の役割、Neuropilin-semaphorin 系の関与についての理解が深まった。

#### 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 14 件)

1. Nakamura, H., Funahashi, J. (2013) Electroporation: Past, present and future. Dev. Growth Differ. 55, 15-19. 査読有  
Doi: 10.1007/978-1-60327-483-8\_27
2. Hou, X., Katahira, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Sugiyama, S., Nakamura, H. (2013) Coactosin accelerates cell dynamism by promoting actin polymerization. Dev Biol. 379, 53-63. 査読有  
Doi: 10.1016/j.ydbio.2013.04.006
3. Watanabe, Y., Nakamura, H. (2012) Nuclear translocation of intracellular domain of PRTG by proteolytic cleavage. Dev. Growth Differ., 54, 167-176. 査読有  
Doi:10.1111/j.1440-169X.2011.01315.x
4. Suzuki, A., Harada, H., Nakamura, H. (2012) Nuclear translocation of FGF8 and its implication to induce Sprouty2. Dev Growth Differ., 54 (4) 463-473. 査読有  
Doi:10.1111/j.1440-169X.2012.01332.x.
5. Nishihara, D., Yajima, I., Tabata, H., Nakai, M., Tsukiji, N., Katahira, T., Takeda, K., Shibahara, S., Nakamura, H., Yamamoto, H. (2012) Otx2 is involved in the regional specification of the developing retinal pigment epithelium by preventing the expression of Sox2 and Fgf8, factors that induce neural retina differentiation. Plos One, e48879, 査読有  
Doi: 10.1371/journal.pone.0048879
6. 仲村春和 (2012) 脊椎動物の脳はいかにしてかたちづくられるか 日仏生物学会誌 52, 4-15. 査読無
7. Gotoh H, Ono K, Takebayashi H, Harada H, Nakamura H, Ikenaka (2011) Genetically-defined lineage tracing of Nkx2.2-expressing cells in chick spinal cord. Dev. Biol., 349, 504-511 査読有  
doi: 10.1016/j.ydbio.2010.10.007
8. Hou, X., Omi, M., Harada, H., Ishii, S., Takahashi, Y., Nakamura, H. (2011) Conditional knockdown of target gene expression by tetracycline regulated transcription of double strand RNA. Dev Growth Differ 53, 69-75. 査読有  
Doi:10.1111/j.1440-169X.2010.01229.x
9. Ito, K., Nakamura, H., Watanabe, Y. (2011) Protogenin mediates cell adhesion for ingression and re-epithelialization of the paraxial mesodermal cells. Dev Biol. 351, 13-24. 査読有

Doi: 10.1016/j.ydbio.2010.11.024

10. Omi, M., Harada, H., Nakamura, H. (2011) Identification of retinotectal projection pathway in the deep tectal laminae in the chick. *J Comp Neurol.* 519:2615–2621, 査読有  
Doi: 10.1002/cne.22642
11. Suzuki-Hirano, A., Harada, H., Sato, T., Nakamura, H. (2010) Activation of Ras-ERK pathway by Fgf8 and its downregulation by Sprouty2 for the isthmus organizing activity. *Dev. Biol.*, 337, 284-293. 査読有  
Doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.044
12. Tanaka, J., Harada, H., Ito, K., Ogura, T., Nakamura, H. (2010) Gene manipulation of chick embryos in vitro, EC culture, and long survival in transplanted eggs. *Dev Growth Differ* 52, 629-634. 査読有  
Doi:10.1111/j.1440-169X.2010.01198.x

[学会発表] (計 30 件)

1. Hou, X., Omi, M., Harada, H., Ishii, S., Takahashi, Y., Nakamura, H.: Conditional knockdown of target gene expression: Tet-on of transcription of double strand RNA. Chick 7: Avian Model Systems, 7<sup>th</sup> International Chick Meeting. 14-18 Nov.2012, Nagoya
2. Funahashi, J., Nakamura, H.: Time-lapse imaging system with shell-less culture chamber. Chick 7: Avian Model Systems, 7<sup>th</sup> International Chick Meeting. 14-18Nov.2012, Nagoya
3. 仲村春和 脊椎動物脳の領域化のメカニズム 埼玉大学研究機構・脳科学融合研究センターシンポジウム「脳の発生・発達とその

破綻の理解をめざして」2012年10月6日、埼玉大学

4. Suzuki A, Harada H, Nakamura H: Possibility of FGF8 as a nuclear factor. Third UCL-Tohoku University Joint Symposium. From Cell/Developmental Biology to Human Diseases. London, Great Britain, October 19, 2011
5. 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, Great Britain
6. 仲村春和「脳の設計図とその書き換えによる自在な脳の作り替え」第2回 東北大学バイオフォーラム ～ 脳科学の革新的な発展を目指して～ 2009年6月5日、東京

[学会主催] (計 4 件)

1. Chick 7: Avian Model Systems, 7<sup>th</sup> International Chick Meeting. Chair of the Organizers: Harukazu Nakamura. 14-18 Nov. 2012, Nagoya
2. UCL-Tohoku University Symposium, From Cell/Developmental Biology to human diseases. Organizers: Harukazu Nakamura & Shinichi Ohnuma. 19 Oct 2011. London, Great Britain
3. Second UCL-Tohoku University Symposium, From Cell/Developmental Biology to Neuroscience. Organizers: Harukazu Nakamura & Shinichi Ohnuma. 23 Jan 2011, Sendai
4. UCL-Tohoku University Symposium, From Cell/Developmental Biology to Neuroscience. Organizers: Harukazu Nakamura & Shinichi Ohnuma. 15 March 2010, London, Great Britain

[図書] (計 3 件)

1. 仲村春和 勝部憲一監訳 (2012) キメラ・クローン・遺伝子-生命の発生・進化をめぐる研究の歴史—、西村書店 (Nicole Le

Douarin 著 Des Chimeres, des Clones et des genes からの翻訳)

Pp331-331

2. 実験医学別冊 (2012) 医学書院 仲嶋一範, 北村義浩, 武内恒成 / 編 目的別で選べる遺伝子導入プロトコール. Pp99-111 仲村春和 ニワトリ胚への遺伝子強制発現およびノックダウン
3. Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology. Ed Nakamura, H. 2009 Springer Japan, Tokyo.  
Chapter 1 'Short history of electroporation for the study of developmental biology' Harukazu Nakamura, pp3-7  
Chapter 2 'In ovo electroporation as a useful tool to pursue molecular mechanisms of neural development in chick embryos. Odani, N., Hou, X., Nakamura, H. pp9-16  
Chapter 10 'Retinal fiber tracing by in ovo electroporation' Harada, H., Nakamura, H. pp97-104.  
Chapter 12 'Clonal and widespread gene transfer by proviral electroporation for analysis of brain laminar formation' Sugiyama, S., Nakamura, H. pp117-127.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○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

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所・教授  
研究者番号 : 90079690

(2)研究分担者

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :