

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 眼の形態形成制御遺伝子の機能的カスケードの解明

2 研究者氏名: 太田訓正

3 研究の狙い:

眼はほとんどの動物が持つ重要な感覚器官である。眼の発生は形態学的にはよく研究されてきたが、眼の形づくりの分子メカニズムはほとんど明らかになってない。しかしながら、レンズが眼の形成に関わる重要な分子を発現していることは古典的な実験から示されている。本研究では、レンズ由来の新しい分泌型タンパク質の機能解析を中心として、眼の形態形成時における分子間の機能的カスケードを研究することにより、眼の形づくりの分子メカニズムの解明を目指した。

4 研究成果:

レンズ由来の分子は分泌型または膜貫通型タンパクと考えられるので、私はシグナルペプチドをコードする cDNA フラグメントを効率よく単離できるシグナルシーケンストラップ法を用いて分子の探索を行った。スクリーニングの結果3つの新規分泌型タンパクを同定した。

**Akhirin:** 748アミノ酸から構成され、LCCLドメインと2つのVWAドメインを持つ。Akhirinを恒常的に発現する細胞株を樹立し、細胞集合解析を行ったところ Akhirin は細胞接着活性を持つことが明らかになった (Ahsan et al., in press)。Akhirin は網膜神経幹細胞が存在する ciliary marginal zone (CMZ) と呼ばれる領域に特異的に発現している。アフリカツメガエル胚を用いた過剰発現実験では、異所性の網膜色素上皮や眼胞の発現を誘導した。

**Equarin:** 601アミノ酸から構成される Equarin-S と958アミノ酸から構成される Equarin-L が存在する。両分子ともレンズにおいて赤道線上に発現し、背 腹に沿って濃度勾配を持って発現する。過剰発現実験では、網膜の腹側半分を欠損する表現系が得られた (Mu et al., 2003)。レンズにおいて背腹軸に濃度勾配を持って発現する分子として Equarin が初めて報告され、眼の背 腹軸の極性形成にも関与することが期待できる。

**Tsukushi:** 369アミノ酸から構成され、その構造の大部分を12個のロイシンリッチリピートからなりN末端とC末端にシステインリッチドメイン持つ。眼胞 眼杯形成時には背側に発現が見られ、発生が進むとCMZに局在する。いろいろな動物種の Tsukushi (トリ、アフリカツメガエル、マウス、ヒト、ゼブラフィッシュ) をアフリカツメガエル胚に過剰発現させると、注入する Tsukushi mRNA の濃度に依存して網膜の形成異常を示す様々な表現系が観察され、最もひどいものでは眼が全く形成されなかった。また、Tsukushi 遺伝子を欠損させたマウスでは網膜の層構造が形成された後、光受容体細胞層が特異的に欠失していく表現形を得た。

アフリカツメガエル胚やニワトリ胚を用いた実験や生化学的解析により、Tsukushi は全く新しいタイプのBMPアンタゴニストであることを明らかにした。ニワトリ初期胚ではTsukushiはオーガナイザーであるヘンゼン結節と線条に発現し、BMP4とそのアンタゴニストである chordin と共に3量体を形成することにより極めて初期の形づくりにおいて重要な役割を持つことを示した (Ohta et al., 2004)。

今後の研究課題として各々の分子について以下のように計画している。Tsukushi はBMPやchordinと相互作用をすることが示せたが、Equarin, Akhirin については相互作用を行う相手分子の同定が急務であると考えられる。Equarin はレンズ上皮細胞がファイバー細胞に分化する赤道領域に局在し、背側から腹側にかけて勾配を持って発現しているが、この発現パターンは何を意味するのか(例えば、網膜の背 腹軸の極性を決定する)を解明したい。細胞接着活性を持つ Akhirin は網膜の層構造形成時期には全ての層に発現している。細胞接着分子 N-cadherin は網膜の層構造形成に関与していると報告されているので、Akhirin も同様の機能を有するか検討する。Tsukushi に関してはオーガナイザー形成に関わる重要なコンポーネントの一つであることが示せたが、体軸形成にも関与していることが分かりつつある。また、いろいろな動物の神経網膜幹細胞に Tsukushi が発現していることから、神

経網膜幹細胞における機能を明らかにしたい。さらに Tsukushi KO マウスの光受容細胞が加齢と共に特異的に欠失する表現形とヒトの網膜疾患の関係も調べていきたい。

#### 5 自己評価:

眼は中枢神経系の一部であり、神経の発生・分化や軸索伸長のよいモデルとして研究されてきたが、私を含めて神経網膜の研究をしている多くの研究者は物を見るためには必須であるレンズにほとんど関心を持たなかった。レンズが眼の発生に欠かせないことや視神経の伸長や伸びる方向を決めていることから、レンズ由来の網膜発生に影響を与える分子を探索する目的で本研究はスタートした。3つの新規分泌型タンパクを同定し、それぞれが眼の形態形成において何らかの機能を持つことが示せた。これは私自身が Cambridge 大学の Harris 教授の研究室に1ヶ月間滞在して習った、アフリカツメガエル胚を用いたマイクロインジェクション法を機能解析手段として用いたことが良かったと思う。Tsukushi はニワトリ初期胚においてオーガナイザーと線条に特異的に発現しており、アフリカツメガエルやゼブラフィッシュの初期胚でも同様の発現パターンを示す。また Tsukushi が BMP アンタゴニストであることが分かりつつあったので、初期発生における Tsukushi の機能解析を中心に研究を進めてしまい、さきがけ研究のテーマからはしばらく外れてしまったが総括並びにアドバイザーの先生方から理解をしていただきとても有り難かった。学生時代から神経一筋で研究を行ってきたが、初期発生やシグナルカスケードの勉強を行い改めて発生生物学のおもしろさを認識した。さきがけ研究の3年間を通して今後の研究課題を見出せたと思う。

#### 6 研究総括の見解:

自己が発見した新規タンパク質 Clone 179 の眼形成における機能の解明を当初の目的とした。研究を進めるに及び、眼に発現する分泌因子 Tsukushi が発生の初期過程でオーガナイザー領域等に発現することを見出し、その発現パターンが「つくし」に似ているところから Tsukushi と命名したこの因子に焦点を絞って研究を展開した。その結果、このタンパク質が chordin との相互作用を通じて BMP 活性を阻害することで、オーガナイザー・インデューサーとして作用するという重要な発見に結びつけた。したがって、当初の目標の到達は今後の課題となったが、本研究で得られた成果は個体形成の機構の解明に大きく貢献すると考えられる。アドバイザー等の助言や指摘を十分活かし研究の方向を果敢に変更し発展性のある成果を収めた点を高く評価する。

#### 7 主な論文等:

##### 原著論文

1. Mu, H., **Ohta, K.**, Kuriyama, S., Shimada, N., Tanihara, H., Yasuda, K., and Tanaka, H. (2003). Equarin, a novel soluble molecule expressed with polarity at chick embryonic lens equator, is involved in eye formation. *Mech. Dev.* 120, 143-155.
2. **Ohta, K.**, Lupo, G., Kuriyama, S., Keynes, R., Holt, C.E., Harris, W.A., Tanaka, H., and Ohnuma, S. (2004). Tsukushi functions as a novel organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin. *Dev. Cell* 7(3), 347-358.
3. Ahsan, M., **Ohta, K.**, Kuriyama, S., and Tanaka, H. (2005). A novel soluble molecule, Akhirin, is expressed in the embryonic chick eye exhibits a heterophilic cell adhesion activity. *Dev. Dyn.* 233, 95-104

##### 口頭発表

1. 太田訓正, Giuseppe Lupo, 大沼信一, 栗山正, 田中英明: 新規 BMP アンタゴニスト, Tsukushi, はオーガナイザー形成に関与する。第36回日本発生生物学会 札幌 2003年6月
2. 栗山正, Giuseppe Lupo, 大沼信一, 太田訓正, 田中英明: 新規分泌型因子 *Xenopus Tsukushi* の発現及び機能解析。第36回日本発生生物学会 札幌 2003年6月
3. Ohta, K., Lupo, G., Ohnuma, S., Kuriyama, S., Keynes, R., Holt, C.E., Harris, W.A., and Tanaka, H.

Tsukushi, a novel BMP inhibitor, is involved in the organizer formation. Society for Developmental Biology 62<sup>nd</sup> Annual Meeting, July 30-August 3, 2003 Boston, MA, USA.

4. 太田訓正、Giuseppe Lupo、大沼信一、栗山正、田中英明: 新規 BMP アンタゴニスト, Tsukushi, の同定と機能解析。第26回日本分子生物学会 神戸 2003年12月
5. 栗山正、Giuseppe Lupo、大沼信一、太田訓正、田中英明: 新規分泌型因子 Xenopus Tsukushi の発現及び機能解析。第26回日本分子生物学会 神戸 2003年12月
6. 太田訓正、Giuseppe Lupo、大沼信一、栗山正、田中英明: Tsukushi と Chordin によるオーガナイザー形成の制御。第37回日本発生生物学会 名古屋 2004年6月
7. 栗山正、Giuseppe Lupo、大沼信一、太田訓正、田中英明: 新規 BMP アンタゴニスト X-TSK の神経提形成における機能解析。第37回日本発生生物学会 名古屋 2004年6月
8. 太田訓正、Giuseppe Lupo、大沼信一、栗山正、田中英明: Involvement of Tsukushi in organizer formation by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin。第27回日本分子生物学会 神戸 2004年12月
9. 栗山正、Giuseppe Lupo、大沼信一、太田訓正、田中英明: Tsukushi ノックアウトマウスの解析。第27回日本分子生物学会 神戸 2004年12月