

イモリ網膜再生の時期特異的遺伝子の単離

星野 明香 (筑波大学 生物学類 4年)

指導教官: 千葉 親文 (筑波大学 生物科学系)

一般に、網膜を含む脊椎動物の中樞神経組織は、障害を受けると再生しないと考えられている。ところが、有尾両生類のイモリの網膜は、手術によって完全に除去しても、残った網膜色素上皮 (RPE) 細胞を起源として再生し、光情報処理機能を回復することができる。イモリの網膜再生については、これまでに形態学や生理学による研究がなされてきたが、その分子メカニズムは明らかにされていない。網膜再生のメカニズムが明らかになれば、我々の中樞神経組織の再生に何らかのヒントを与えることになるかも知れない。

イモリの網膜再生過程では、網膜を構成する各種神経細胞は発生過程とよく似た順序で出現する。このことから、再生における神経分化の過程には発生と共通の遺伝子プログラムが働く可能性が示唆される。一方、網膜再生の起源が分化した RPE 細胞であることや、網膜形成の場が成体の眼球内であることを考慮すると、そうした遺伝子の発現を調節するメカニズムは再生独特なものであると推測される。そこで、本研究では、網膜再生の分子メカニズムを明らかにするための基礎として、網膜再生のそれぞれの段階で特異的に発現する遺伝子の単離を試みた。

我々の研究室では、網膜再生に発生と共通の遺伝子プログラムが働くかどうか明らかにする目的で、網膜発生を制御する遺伝子の再生過程における発現を調べている。現在までに、RPE 細胞の分化マーカーの一つである RPE65 遺伝子の発現が再生 10 日 (RPE 細胞が細胞質分裂を始める頃) までに減少する (すなわち脱分化する) ことや、一方で眼形成のマスターコントロール遺伝子である Pax-6 遺伝子がこの頃までに発現することを明らかにしている。また、神経分化を促進するとされる Neurogenin 遺伝子や、幹細胞の性質を維持する働きがあるとされる Hes-1 遺伝子の発現量もこの頃から増加することも分かっている。これらの結果から、RPE 細胞を初期化し、発生の遺伝子プログラムを再起動する細胞内の変化は、再生 0 から 10 日までの間に起こるものと推測される。そこで今回、網膜再生に特異的な遺伝子を得る目的で、特に再生 0 日と 10 日の間で発現量に差のある遺伝子を cDNA サブトラクション法により単離した。

実験には成体のアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を用いた。イモリを 0.1% FA100 (田辺製薬)

で麻酔し、眼球の背側を角膜ときょう膜の境界に沿って切開し、細いピンセットで神経性網膜とレンズを除去した。手術したイモリは、湿った紙を敷いたプラスチック容器に入れ、22°C で飼育した。再生 0 日の total RNA は、正常眼球の eye-cup から神経性網膜を除去した残りの組織 6 個から抽出した。再生 10 日の total RNA は、手術後 10 日の眼球の eye-cup 6 個から抽出した。再生 0 日と 10 日の total RNA を用いて、それぞれ cDNA を作製し、制限酵素で断片化した後、両端に異なる塩基配列のアダプターを連結し、それらをもとに PCR によるサブトラクションを行った。サブトラクティブ PCR の結果得られた DNA を、プラスミドに組み込み、大腸菌を形質転換した後、クローン化した。プラスミド DNA を抽出・精製した後、DNA シークエンサーで各クローンの塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、日本遺伝学研究所 (DDBJ) のデータベースと照合し、既知の遺伝子との相同性を検索した。

再生 10 日特異的な遺伝子として得られたのはクローンは、現在のところ 182 である。相同性検索の結果、CDC10、stathmin などの細胞分裂に関わる遺伝子のクローンが確認された。このことは、再生 10 日の細胞がすでに分裂サイクルに入っていることを示している。また、transferrin など細胞の代謝に関わるハウスキーピング遺伝子も単離された。残ったものの内、102 クローン (全体の 56%) は、働きの知られている遺伝子と相同性を持たない、全く未知の遺伝子であった。今回もちいた PCR による cDNA サブトラクション法では、差時的遺伝子を 100% 完全に分離することはできない。そのため、今後は、RT-PCR などによって、単離したそれぞれのクローンの網膜再生過程における発現動態を調べる必要がある。

また、再生 0 日特異的な cDNA クローンとして約 700 得ている。網膜再生の開始に関わる遺伝子・分子は正常 RPE 細胞で発現していなければならない。そこで、今後これらのクローンの解析を進め、再生開始に関わる遺伝子を見つけたいと考えている。

また、1~2 層の網膜神経前駆細胞が出現する再生 20 日頃、網膜神経細胞が機能分化し始める 23 日頃、シナプス層が発達する 28 日頃、網膜が形態的にはほぼ再生する 45 日頃からも同様の方法で遺伝子を単離し、それぞれの段階に必須な遺伝子を見つけ、最終的に中樞神経系再生のメカニズムを明らかにしていきたい。