

氏 名 于 洋

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2046 号

学位授与の日付 平成 30 年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Regulation of retinal axonal projections by the R3
receptor-like protein tyrosine phosphatase subfamily in mice

論文審査委員 主 査 教授 東島 眞一
准教授 新谷 隆史
准教授 椎名 伸之
教授 渡邊 利雄
奈良女子大学 人間文化研究科

博士論文の要旨

氏 名 于 洋

論文題目 Regulation of retinal axonal projections by the R3 receptor-like protein tyrosine phosphatase subfamily in mice 受容体型プロテインチロシンホスファターゼ R3 サブファミリーによるマウス視神経投射の制御

The correct axonal projections of retinal ganglion cells are a prerequisite for proper vision and vision-guided behaviors. Retinal axons pass through the optic chiasm (OC), and then make terminal zones in the superior colliculus (SC). In mice, most axons cross the midline and project contralaterally, whereas a fraction of retinal axons from the ventrotemporal region avoid the midline of the OC and project ipsilaterally. In the SC, retinal axons establish the topographic map: nasal and temporal axons project to the posterior and anterior SC, respectively, while dorsal and ventral retinas are connected to the lateral and medial SC, respectively. Eph receptor protein tyrosine kinases and their ligands ephrins have been implicated in the retinal axonal projection through the OC and the establishment of topographic maps in the SC. Our laboratory previously demonstrated that PTPRO, a receptor-like protein tyrosine phosphatase (RPTP), controlled the projection of retinal axons through the regulation of Eph receptors in chick. But it has not been elucidated which RPTPs regulate Eph receptors in the retinal axons in mammals.

RPTPs are classified into eight subfamilies based on the sequence homology. The R3 RPTP subfamily, including PTPRB, PTPRH, PTPRJ and PTPRO, is characterized by extracellular fibronectin type III repeats, a transmembrane domain, and a single phosphatase domain in the intracellular regions. In this study, I investigated functional roles of R3 RPTPs in the mouse retinal axonal projection.

First, I examined mRNA expression of R3 RPTPs in the mouse retina, and I found that *Ptpro* and *Ptprj*, but not *Ptprb* or *Ptprh*, were expressed in the developing retina. The expression level of *Ptprj* was markedly higher than that of *Ptpro*. *In situ* hybridization showed that both *Ptprj* and *Ptpro* were expressed in the ganglion cell layer and inner nuclear layer. To determine whether PTPRJ and/or PTPRO influence the projection of retinal axons, I examined *Ptpro*-knockout (*Ptpro*-KO), *Ptprj*-KO, and *Ptpro/Ptprj* double-KO (DKO) mice. I found that phosphotyrosine levels of both EphA and EphB receptors were significantly upregulated in the *Ptprj*-KO and DKO retina, but not in the *Ptpro*-KO retina. To investigate the sensitivity of retinal axons to ephrins, I performed neurite extension assays using ephrinB2, and growth cone collapse assays using ephrinA2 and ephrinA5, and revealed that the sensitivity to these ephrins was

significantly enhanced in retinal axons of *Ptprj*-KO and DKO mice.

Next, I examined the projection of retinal axons through the OC and topographic map formation in the SC in these mutant mice. *In vivo* axon tracing experiments revealed that the proportion of retinal axons that projected ipsilaterally or misrouted to the contralateral eye at the OC was increased in *Ptprj*-KO mice and DKO mice compared with WT mice. These results suggested that PTPRJ mainly controlled the guidance of retinal axons at the OC through the regulation of EphB signaling. In addition, nasal, ventral, and centrotemporal retinal axons of *Ptprj*-KO and DKO mice exhibited ectopic terminal zones anteriorly shifted in the SC. These results indicated that retinal axons of *Ptprj*-KO and DKO mice exhibited hyperactivity to ephrins. In all analyses, I detected no significant difference between WT and *Ptprj*-KO mice.

Eph signaling is reportedly mediated by c-Abl kinases in some cell types. I examined the activation of c-Abl after stimulation with ephrinB2 and ephrinA2 in dissociated retinal neurons and found that these ephrins induced the phosphorylation (activation) of c-Abl. Furthermore, neurite extension assays and growth cone collapse assays indicated that Eph repulsive signaling is partially mediated by c-Abl. I demonstrated that c-Abl was a substrate for PTPRO and PTPRJ. And I found that phosphorylation levels of c-Abl in the *Ptprj*-KO and DKO retina, but not in the *Ptpro*-KO retina, were significantly higher compared with the WT retina. Forced activation of c-Abl kinases *in vivo* by a c-Abl activator induced similar abnormal retinal axonal projections observed in *Ptprj*-KO and DKO mice: when mice were treated with a c-Abl activator, the proportion of retinal axons that projected to the ipsilateral side or misrouted to the contralateral eye at the OC was increased, and nasal axons aberrantly terminated anterior to their topographically appropriate position of the SC. These results suggested that c-Abl kinases are required for the transduction of repulsive signals of Eph receptors in retinal axons, and that PTPRJ suppresses the tyrosine kinase activity of c-Abl kinases as well as that of Eph receptors. Taken all together, I concluded that PTPRJ mainly regulates the projection of retinal axons through the suppression of Eph signaling by dephosphorylating both Eph and c-Abl kinases.

(備考)

- 1 用紙の大きさは、日本工業規格 (JIS) A 4 縦型とする。
- 2 和文で作成する場合は 2,000 字~3,000 字、英文で作成する場合は 700 語~2,000 語程度とする。
ただし、生命科学研究所に出願 (申請) する場合は、英文 700 語程度で作成すること。
- 3 1 行あたり 40 文字 (英文の場合は 80 文字)、1 ページあたり 40 行で作成する。
- 4 上マージン、下マージン、右マージンは 2 cm、左マージンは 2.5 cm とする。

- 5 タイトルと本文の間は、1行空ける。
- 6 片面印刷とし、ホチキス止めをしないこと。
- 7 別紙の添付は不可。
- 8 ページ番号は入れないこと、また改行を行わないこと。
- 9 図表を挿入する際は、白黒印刷でも判別できるように配慮すること。
- 10 論文審査に合格し、博士号が授与された場合は、本要旨を総合研究大学院大学リポジトリにおいて、インターネット公開する。

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 于洋

Title
論文題目 Regulation of retinal axonal projections by the R3 receptor-like protein tyrosine phosphatase subfamily in mice

網膜で受容・処理された視覚情報は視神経軸索によって脳内に伝達される。発生期において、網膜から伸び出した視神経軸索は視交叉を通過して反対側の上丘においてトポグラフィックな投射 (topographic projection) と呼ばれる、領域特異的な神経結合を形成する。

受容体型プロテインチロシンキナーゼ (RPTK) である Ephs とそのリガンド分子である ephrins が、視神経の投射形成に必須の役割を果たしていることが知られている。Ephs を高発現する軸索が ephrins に接触すると、反発性の反応が生じる。これまでに、ニワトリの視神経のトポグラフィックな投射において、受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (RPTP) の一つである PTPRO が Ephs の活性を抑制することによって重要な役割を果たしていることが明らかになっている。しかしながら、これまで哺乳類の視神経において Ephs の活性を制御している RPTP は不明のままであった。一方、培養細胞を用いた解析から、哺乳類の R3 PTP サブファミリーに属する PTPRO, PTPRJ, PTPRB, および PTPRH のいずれもが Ephs を脱リン酸化することが明らかになっていた。そこで申請者の于洋氏は、マウス視神経の投射形成における R3 PTP サブファミリーの役割について解析を行った。

申請者は、まず、発生期のマウス網膜における R3 PTP サブファミリーの発現の解析を行い、PTPRJ と PTPRO の二つが網膜に発現しており、PTPRJ の発現量が PTPRO の発現量よりも顕著に高いことを見出した。次に、PTPRJ と PTPRO の視神経投射における役割を明らかにするために、それぞれの遺伝子欠損マウスと両者の二重欠損マウスについて解析を行った。その結果、*Ptprj* 欠損マウスと二重欠損マウスの網膜における Ephs のリン酸化が、野生型マウスに比べて有意に高いことを見出した。さらに、網膜の培養系を用いた解析によって、Ephs を介した軸索の ephrins に対する反発性の応答が野生型マウスに比べて *Ptprj* 欠損マウスと二重欠損マウスにおいて有意に増強していることを明らかにした。

続いて、各マウスの視神経の脳内への投射について調べた結果、視交叉を避けて同側性に投射する視神経の割合と、反対側の眼に向かって逆走行する視神経の割合が *Ptprj* 欠損マウスと二重欠損マウスにおいて有意に増加していることを見出した。また、上丘におけるトポグラフィックな投射について調べたところ、*Ptprj* 欠損マウスと二重欠損マウスにおいて、視神経の投射位置が正常な投射位置から前側にシフトしていることが明らかになった。これらの結果は、PTPRJ による Ephs の活性抑制が無くなったために、視神経軸索が ephrins に対してより強い反発性の応答をしたためと解釈された。

申請者はさらに、視神経における Ephs の反発性の情報伝達において、非受容体型のプ

ロテインチロシンキナーゼである c-Abl が必須の役割をしていること、また、PTPRJ は c-Abl を基質として脱リン酸化することによって、その活性を抑制していることを見出した。以上の結果から、視神経の投射形成において PTPRJ が Ephs と c-Abl の両者を脱リン酸化することによって反発性シグナルの抑制に働いていることが明らかになった。

以上の申請者の研究は、哺乳類の視神経投射形成における新しい制御機構を明らかにするとともに、解明が進んでいない RPTPs の生理機能に対する理解を大きく前進させるものであり、本研究論文は学位授与に値すると審査委員全員一致で判断した。