

古川 貴久

(財)大阪バイオサイエンス研究所発生生物学部門・研究部長

網膜神経回路のシナプス形成と生理機能発現の解析

§ 1. 研究実施の概要

本研究は、中枢神経系のモデルとして網膜に注目し、「シナプスの特異的結合の分子メカニズム」および「網膜神経回路の生理機能と動作メカニズム」を解明することを目的としている。網膜神経回路構築の分子レベルでの理解を進めると同時に、遺伝子組み換えマウスを用いて電気生理学的解析や視覚行動解析を行い、網膜神経回路がどのようなメカニズムと機能原理に基づき視覚情報処理を行っているかを明らかにすることを旨とし、本年度は以下の2項目の研究を実施した。

1) 網膜におけるシナプス形成の分子基盤解明

我々は、ピカチュリンをはじめとして網膜に高発現する細胞外マトリックス蛋白質が網膜シナプス形成に重要な役割を果たしていると考えている。そのメカニズムの解明を目指して、網膜に高発現する細胞外マトリックスであるジストログリカン遺伝子の網膜特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製した。組織化学的ならびに機能的解析を行って、網膜シナプス形成のメカニズムの理解を進めていく。

また、網膜組織培養系を用いた新規なシナプス形成因子のスクリーニングの実施に向けて、我々の網膜発現解析ならびにデータベース解析を通じて、網膜や脳のシナプス形成に関与の可能性が考えられる候補分子選択を行った。現在それら遺伝子群の単離を行っている。コントロール分子を用いてマウス網膜への *in vivo* エレクトロポレーション法によってコントロール実験を行っている。

2) 網膜神経回路の解析

我々は網膜 ON 双極細胞の活動を司るイオンチャネルが TRPM1 であることを見出し報告したが、さらに、ヒト TRPM1 の変異が先天性停止性夜盲症の原因遺伝子となっていることを、名古屋大学眼科教室との共同研究で明らかにした。このことから、ヒトにおいても TRPM1 が網膜 ON 型双極細胞の活動を司ることが明らかとなり、医学的にも先天性停止性夜盲症の診断・治療に役立つ成果と考えられ

る。また、網膜神経回路を解析する目的で、遺伝子組み換えマウスの作成を開始した。これら遺伝子組み換えマウス網膜における組織レベルでの視覚刺激への反応や受容野の測定、個体レベルでの視覚機能などを検定し、網膜神経回路の作動原理の解明を目指していく。

§ 2. 研究実施体制

(1) 古川グループ

①研究分担グループ長: 古川 貴久 ((財)大阪バイオサイエンス研究所、研究部長)

②研究項目

1) 網膜におけるシナプス形成の分子基盤解明

a) シナプスの陥入構造形成メカニズムの解明

・ジストログリカンの網膜特異的コンディショナルKO (CKO) の解析

・agrin floxマウスの作製

b) シナプス位置決定メカニズムの解明

2) 網膜組織培養系を用いたshRNAライブラリ導入による新規なシナプス形成因子のスクリーニング

・網膜や脳のシナプス形成に関与の可能性が考えられる「細胞外マトリックス蛋白質」、
「膜蛋白質」の選択

・平面型マルチ電極アレイによるマウス網膜のERGと神経節細胞のスパイク測定のセットアップ

3) 網膜神経回路の解析

・水平細胞、AIIアマクリン細胞の選択的破壊マウスの作製と視覚機能解析

・水平細胞選択的破壊モデルマウスの作製

(2) 立花グループ

①研究分担グループ長: 立花 政夫 (東京大学大学院、教授)

②研究項目

1) マウス網膜剥離標本へのマルチ電極法の適用

2) 光パターン刺激装置の開発

3) 蛍光標識された神経細胞からの光応答の記録

4) 一過性・持続性応答および運動方向選択性応答の発現機構の解析

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

視覚情報は明暗の情報に応じて、双極細胞において初めてONとOFFという経路に分かれることが明らかとなっており、視覚情報処理においてはこの明暗の情報処理(ON, OFF)が決定的に重要であることから、双極細胞のイオンチャネルの実体が注目されてきた。この明暗を区別するON/OFF応答は双極細胞に発現しているイオンチャネルの性質に依存していることが知られていたが、応答の大部分を占めるON型応答を司るイオンチャネルが何であるかは不明であった。我々はTRPM1が網膜の中でも中間ニューロンである双極細胞に特異的に発現していることを見いだした。TRPM1欠損マウスにおいては視細胞は正常に機能しているものの、ON型双極細胞の機能のみが特異的に欠損していることが明らかとなった(OFF型は正常)。培養細胞を用いた強制発現系により、TRPM1がON型双極細胞の未知の視覚伝達チャネルが持つと予想されていた、非選択性の陽イオンチャネルという性質を持ち、mGluR6シグナル経路により抑制的制御を受けることを明らかにし、20年来の謎であったON双極細胞のイオンチャネルの実体を解明した¹⁾(図1)。

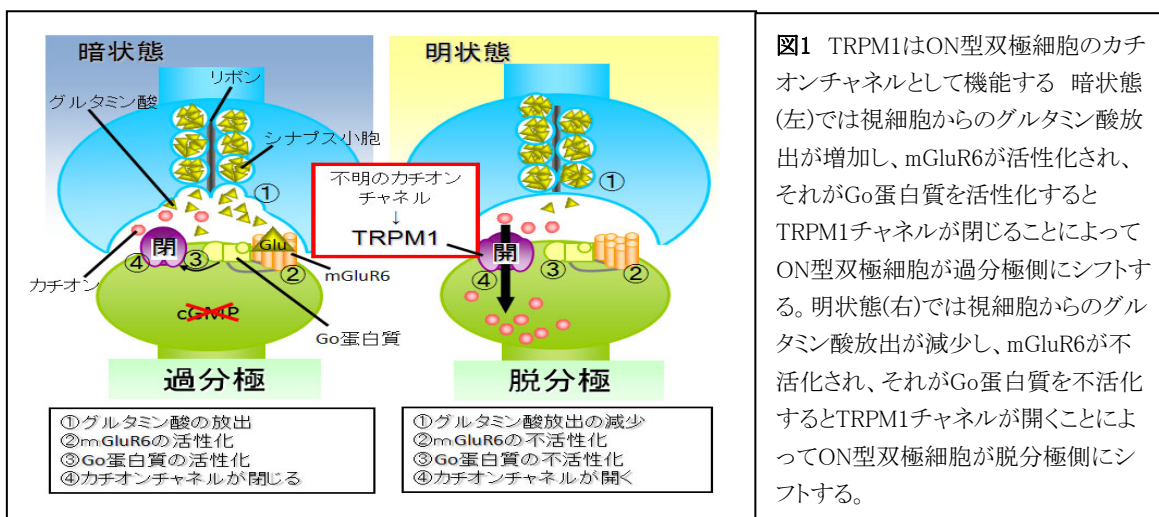


図1 TRPM1はON型双極細胞のカチオンチャネルとして機能する。暗状態(左)では視細胞からのグルタミン酸放出が増加し、mGluR6が活性化され、それがGo蛋白質を活性化するとTRPM1チャネルが閉じることによってON型双極細胞が過分極側にシフトする。明状態(右)では視細胞からのグルタミン酸放出が減少し、mGluR6が不活性化され、それがGo蛋白質を不活性化するとTRPM1チャネルが開くことによってON型双極細胞が脱分極側にシフトする。

ON型双極細胞の機能欠失は、ヒトで完全型先天性停止性夜盲症の原因となっていることが知られている。この疾患では、幼少期より夜盲、眼振、視力低下などの症状が認められる。現在まで、2つの遺伝子が先天性完全型停止性夜盲症の原因遺伝子として同定されてきた。伴性劣性遺伝形式の nyctalopin (ニコタロピン)と常染色体劣性型遺伝形式の mGluR6(代謝型グルタミン酸受容体6)である。我々は、TRPM1ノックアウト (KO)マウスが完全にON双極細胞の機能欠失を示すことから、ヒトTRPM1遺伝子の変異が完全型停止性夜盲症の原因となっているのではないかと考えた。日本国内で、先天性停止性夜盲症の患者DNAを解析している名古屋大学眼科学教室と共同研究を行い、原因遺伝子未同定の患者DNAの TRPM1遺伝子のコーディングエクソン2-27についてゲノムDNAシーケンスを行い、3人の患者から5つの種類のTRPM1の変異を同定することに成功した²⁾(図2)。3人の患者はTRPM1の各アレルがそれぞれ異なる変異を有するコンパウンドヘテロであることが明らかとなった(図2A,B)。我々は、これらの変異がTRPM1の機能欠損につながるかを検定した。

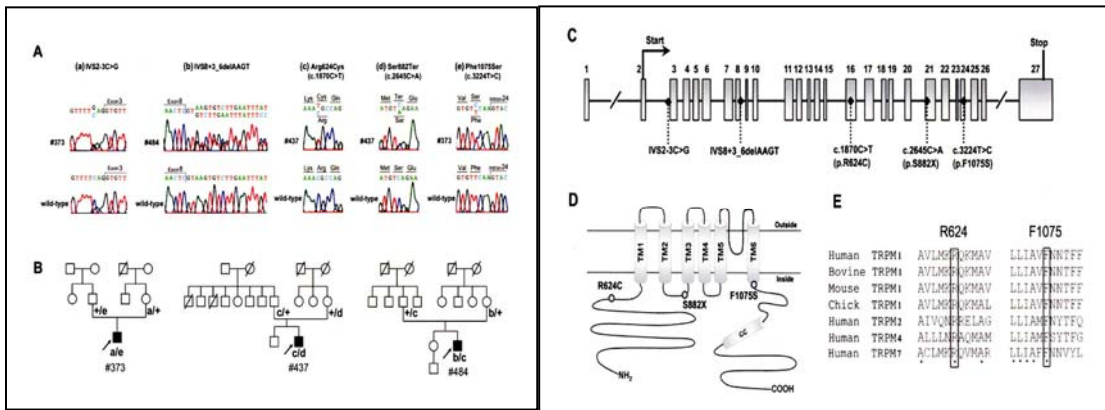
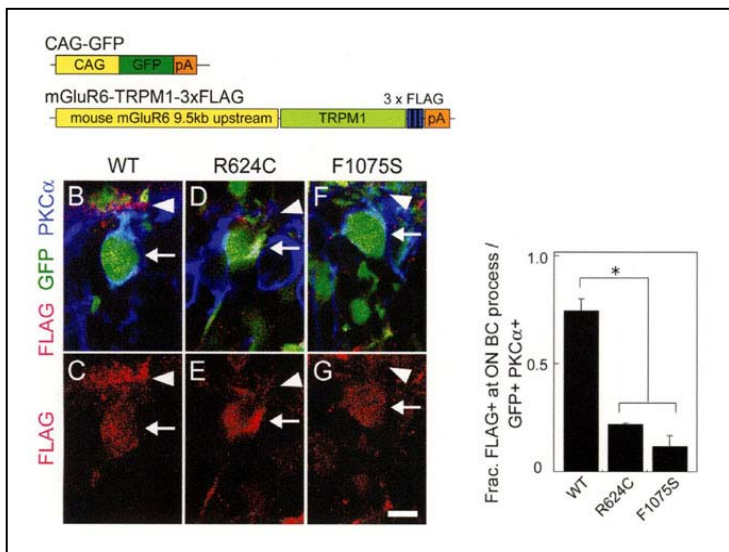


図2 (A) 完全型先天性停止性夜盲症で同定されたTRPM1遺伝子の変異シーケンス (B) 完全型先天性停止性夜盲症患者の家系図 (C) ヒトTRPM1遺伝子のエクソン-イントロン構造と変異部位 (D) TRPM1蛋白質の2次構造と変異部位 (E) 2つのミスセンス変異(R624CとF1075S)領域の進化的保存

5つの変異のうち、2つの変異はイントロン2-エクソン3 (IVS2-3C>G)ならびにエクソン 8-イントロン8 (IVS8+3_delAAGT)の境界部位に存在し、スプライシングの異常が推定された (図2C)。我々は、これらの変異を導入したイントロン-エクソンを用いたミニジーンコンストラクトを作成し、スプライシングアッセイを培養細胞内で行ったところ、どちらの変異においてもスプライシングの異常と蛋白質の合成が欠失したことから、これらのイントロン-エクソン変異がTRPM1蛋白質の不合成につながることを明らかにした。これら以外の3つの変異はエクソン内の点突然変異であり、1つは膜貫通ドメイン2と3の間にストップコドンが出現するナンセンス変異で、TRPM1の機能喪失が強く示唆された (図2D)。2つのミスセンス変異 (R624CとF1075S)はヒトから、ウシ、マウス、トリの間で進化的に良く保存された領域にあり (図2E)、重要な機能の欠損が推測された。我々は、ON型双極細胞におけるTRPM1蛋白質の局在に異常を引き起こすのではないかと仮説を立てた。mGluR6プロモーター下流に2種類の変異をそれぞれ導入したヒトTRPM1 cDNAをつなぎ、マウス網膜にin vivo エレクトロポレーション法にて導入発現させたところ、野生型TRPM1はON型双極細胞の樹状突起終末に局在したにもかかわらず、2種類の変異TRPM1蛋白質は共に樹状突起終末への局在が大幅に減



少しており、これらのミスセンス変異はどちらもTRPM1蛋白質の樹状突起終末局在の異常をもたらすことが示された (図3)。

図3 (A) in vivoエレクトロポレーションに用いた野生型ならびに変異導入TRPM1発現コンストラクト (B-G) 生後0日でin vivoエレクトロポレーションした網膜の切片像 (生後14日目) (H) 樹状突起に局在するTRPM1蛋白質の変異による変化の定量データ

以上の結果から、我々は、今回解析した先天性停止性夜盲症の患者においては TRPM1 の変異が疾患の原因となっていると結論した。今回の成果は、ヒトの新たな網膜疾患の原因遺伝子を同定し、その異常の原因を機能的に明らかにしたものであり、神経科学分野での情報伝達の基礎的理解への貢献のみならず医学的な見地からも、網膜疾患の診断や治療に結びつく成果と考えられる。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- 1) Nakamura M, Sanuki R, Yasuma R T, Onishi A, Nishiguchi M K, Kadowaki M, Kondo M, Miyake Y, Furukawa T: TRPM1 mutations are associated with the complete form of congenital stationary night blindness. *Mol Vis* 16: 425-437, 2010. DOI: N/A

- 2) Koike C, Obara T, Uriu Y, Numata T, Sanuki R, Miyata K, Koyasu T, Ueno S, Funabiki K, Tani A, Ueda H, Kondo M, Mori Y, Tachibana M, Furukawa T: TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 332-337, 2010. DOI: 10.1073/pnas.0912730107