

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目指し、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

私達は、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、ピカチュリンと相互作用する蛋白質ジストログリカンの網膜・視細胞特異的コンディショナルノックアウト(CKO)マウスの解析を行った。CKO マウスではシナプス間隙に発現するピカチュリンが拡散しており、網膜電図(ERG)では双極細胞由来の応答の減少および伝達遅延を示した。また、ジストログリカンが糖鎖修飾を介して相互作用する事およびピカチュリンがオリゴマーを形成することを確認し、視細胞シナプス形成の分子機構の理解を進めた。

さらに、私達は神経細胞においてシナプスに次ぐ第二の入力装置と言われる繊毛の形成と機能について、網膜視細胞をモデルとして解析を行い、網膜における視細胞変性を引き起こす新規なメカニズムを明らかにした。視細胞は双極細胞とリボンシナプスを形成するが、ON型双極細胞のリボンシナプス部に TRPM1 チャンネルが局在する。本研究で、私達は肺小細胞癌やメラノーマの患者の一部でみられる視力障害の原因となる自己抗体の抗原蛋白質であることを明らかにした。これらの成果は、ヒト網膜変性症や癌の診断や治療に結びつく成果と考えられる。

2) 網膜および組織培養系を用いた新規シナプス形成因子の探索

シナプスを形成する分子機構として、シナプス膜に局在する膜貫通蛋白質、シナプス間隙に局在する細胞外マトリックス蛋白質、そしてシナプス膜の内側に存在するアンカー蛋白質の相互作用が考えられる。私達は、これらの分子のうち、網膜で発現する遺伝子の蛍光融合タンパク質を作製し、in vivo エレクトロポレーションを中心にシナプスに局在する分子の探索を行った。

3) 網膜双極細胞間の電気シナプスの役割の解析

網膜の特徴は、伝達物質を介する化学シナプスのみならず、ギャップ結合による電気シナプスが豊富に存在していることである。私達はキンギョ網膜において電気生理学的実験及びトレーサー結合実験を行った。電気シナプスは情報伝達に時間遅れがほとんどないことが特徴であるとされてきたが、本研究の結果、電気シナプスで Ca^{2+} スパイクによる遅延を伴った情報伝達が行われることが明らかとなり、動きの検出や予測などの神経基盤となっている可能性が示唆された。

§ 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 (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 (東京大学大学院文学研究科、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)

視細胞シナプスの機能とヒト疾患

視覚情報処理において明暗は決定的に重要な視覚情報である。明暗の情報は双極細胞において初めて ON(明)と OFF(暗)という経路に分かれることが明らかとなっている。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。私達は ON 型応答を司る双極細胞のイオンチャネルの実体が TRPM1 であることを明らかにした (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, 332-337, 2010)。また、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。私達は、ヒト TRPM1 が完全型停止性夜盲症の原因遺伝子となっていることを突き止めた (*Mol. Vision*, 16, 425-437, 2010)。

これに加え、私達は平成 22 年度の研究で腫瘍関連網膜症にも TRPM1 が関与していることを明らかにした。腫瘍関連網膜症とは、ある種の癌患者における夜盲をともなう視覚障害である。腫瘍由来の抗原に対する自己抗体が、網膜で反応することが原因であるといわれている。その抗原の同定は治療法および腫瘍関連網膜症の診断において重要な鍵となると考えられる。網膜視細胞に対する自己抗体は同定されてきたものの、未だに双極細胞に対する自己抗原は同定されていなかった。癌関連網膜症は主として 2 種類に分けられ、肺小細胞癌、乳癌、子宮癌に随伴する癌関連網膜症 (CAR) と悪性黒色腫に随伴する悪性黒色腫関連網膜症 (MAR) が知られている。私達は TRPM1 が網膜だけでなく、網膜色素上皮や皮膚にも発現していることを見出しており、TRPM1 が腫瘍関連網膜症における自己抗体の抗原になりうるのではないかと考えた。そこで、私達は名古屋大学眼科学教室の近藤峰生準教授らと共同研究を行い、CAR 患者由来の血清に TRPM1 に対する自己抗体が含まれているかをウェスタンブロット解析で検証した (図 1)。

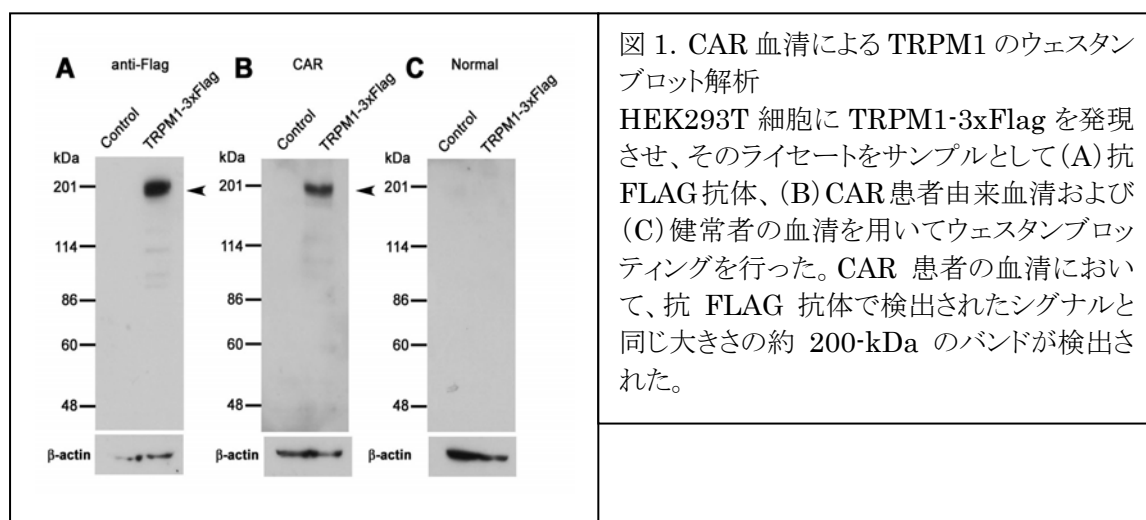
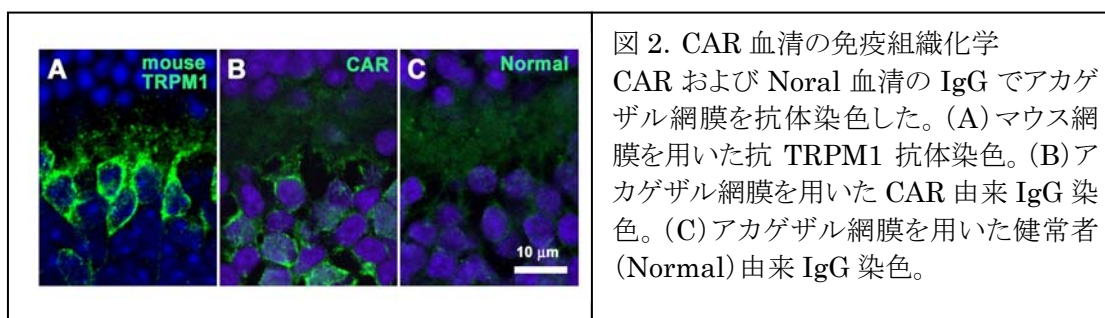


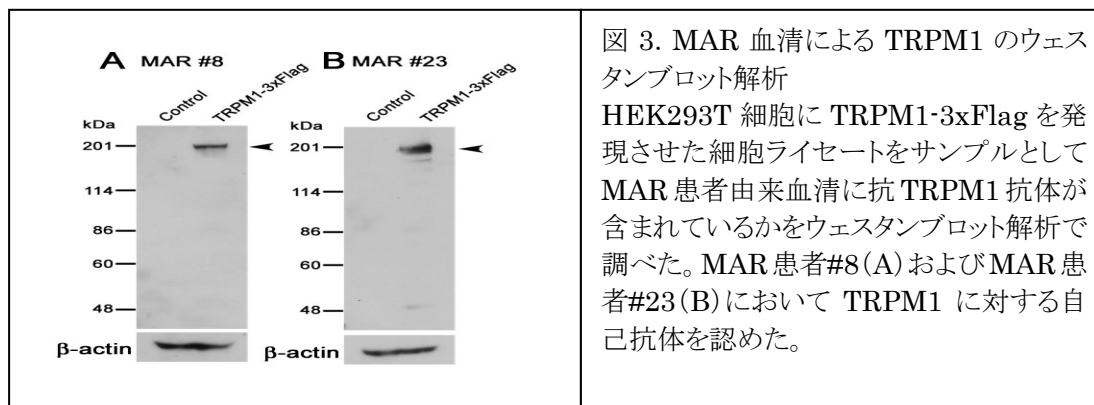
図 1. CAR 血清による TRPM1 のウェスタンブロット解析

HEK293T 細胞に TRPM1-3xFlag を発現させ、そのライセートをサンプルとして (A) 抗 FLAG 抗体、(B) CAR 患者由来血清および (C) 健常者の血清を用いてウェスタンブロットティングを行った。CAR 患者の血清において、抗 FLAG 抗体で検出されたシグナルと同じ大きさの約 200-kDa のバンドが検出された。

その結果、CAR 患者由来の血清に TRPM1 に対する抗体が含まれていることが明らかとなった。私達はさらに、この血清から IgG を精製して、アカゲザル網膜で免疫染色を行い健常者と比較した。CAR 患者 IgG において、マウス網膜における抗 TRPM1 抗体染色と同じ染色像が観察できた(図 2)。



そこで、私達は MAR 患者においても同様に TRPM1 に対する自己抗体が血清中に存在するのではないかと考え、米国オレゴン健康科学大学のアダムス博士と共同研究を行い、26 例中 2 例の MAR 患者においてウェスタンブロットで検出可能な TRPM1 に対する自己抗体が存在していることを明らかにした(図 3)。



以上の結果から、私達は長年、網膜双極細胞に対する自己抗体が存在するのではと言われてきたものの、実体が不明であった自己抗体疾患の一つである腫瘍関連網膜症の双極細胞抗原が TRPM1 チャンネル蛋白質であることを同定し発表した⁵⁾。この研究成果は、神経科学分野での情報伝達の基礎的理解を医学的な見地へと発展させたものである。癌ならびに網膜疾患の診断や治療に直接結びつく成果と考えられる。

神経細胞においてシナプスに次ぐ入力装置である繊毛の長さの調節機構

私達は、マイクロアレイを用いた視細胞に発現する遺伝子の解析から、網膜視細胞の分化やシナプス形成に関わる分子を複数同定してきた^{1), 6)}。そのスクリーニングの中から、機能未知キナーゼ Mak が視細胞に強く発現することを見出した。私達は、まず、Mak に対する抗体を作製し Mak の視細胞における細胞内局在を調べたところ、Mak は繊毛の軸系に局在することがわかった(図 4B 左)。Mak 欠損マウスにおける網膜の発生を観察したところ、網膜の層形成が完了する生後 14

日までに、層構造に大きな変化は見られなかった。しかし、生後3カ月から視細胞層が特異的に薄くなり、12か月では視細胞のほとんどが脱落してしまった(図4 A)。この進行性の視細胞の脱落は、ヒト網膜色素変性症と同様の状態と考えられる。視細胞脱落の原因を解析するために、Mak 欠損マウスの視細胞の繊毛をアセチル化チューブリン抗体で免疫染色したところ、興味深いことに繊毛が2倍以上に伸びていることが観察された(図4 B 右)。さらに、Mak の繊毛における局在を詳しく検定したところ、微小管結合蛋白質 RP1 の局在とオーバーラップすることがわかった。RP1 のノックアウトマウスでは、視細胞の繊毛が短くなることが報告されていたので、私達は RP1 と Mak の関係に注目した。インビトロキナーゼアッセイにより、Mak が RP1 をリン酸化することが明らかとなった。また、培養細胞において RP1 を高発現させると、繊毛が伸長するが、Mak と RP1 を同時に発現させると過剰に伸びた繊毛がレスキューされることがわかった⁴⁾。これらの結果は、Mak が RP1 をリン酸化することで繊毛の長さを調節していることを示唆している。この研究から、網膜における視細胞変性を引き起こす新規なメカニズムが明らかになり、網膜変性疾患の原因解明や治療へとつながる成果と考えられる。

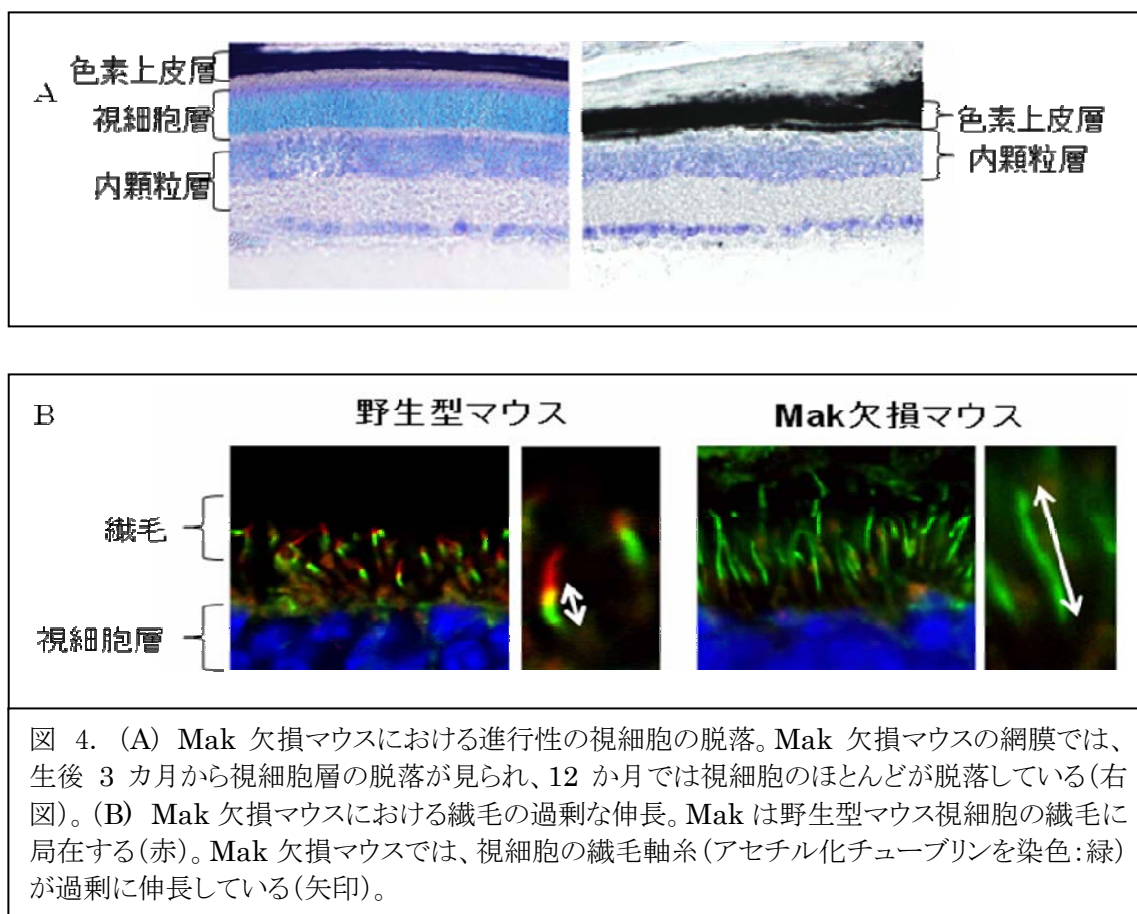


図 4. (A) Mak 欠損マウスにおける進行性の視細胞の脱落。Mak 欠損マウスの網膜では、生後 3 カ月から視細胞層の脱落が見られ、12 か月では視細胞のほとんどが脱落している(右図)。(B) Mak 欠損マウスにおける繊毛の過剰な伸長。Mak は野生型マウス視細胞の繊毛に局在する(赤)。Mak 欠損マウスでは、視細胞の繊毛軸糸(アセチル化チューブリンを染色:緑)が過剰に伸長している(矢印)。

網膜双極細胞間の電気シナプス

網膜の特徴は、伝達物質を介する化学シナプスのみならず、ギャップ結合による電気シナプスが豊富に存在していることである。キンギョ網膜において電気生理学的実験及びトレーサー結合実験を行った結果、巨大な軸索終末部を持つ Mb1 型双極細胞は樹状突起間でギャップ結合を形成していること、また、ギャップ結合には電位依存性や整流性が無く、ローパス・フィルターの周波数特性を持っていることが明らかとなった(図 5)。また、近隣にある Mb1 型双極細胞同士の自発性膜電位変動は同期しており、ノイズの低減に役立っていることがわかった。さらに、ギャップ結合した電気的ネットワークでは、 Ca^{2+} スパイクによる広範な側方情報伝達が行われているという新たな知見が得られた(図 6)。Mb1 型双極細胞から神経節細胞への化学シナプス伝達を調べた結果、双極細胞間の電気的ネットワークを介する時間遅れを伴う側方情報伝達が、神経節細胞に非常に長い応答を引き起こすことを明らかにした。従来、電気シナプスは情報伝達に時間遅れがほとんどないことが特徴であるとされてきたが、本研究の結果、電気シナプスで Ca^{2+} スパイクによる遅延を伴った情報伝達が行われることが明らかとなり、動きの検出や予測などの神経基盤となっている可能性が示唆された⁷⁾。

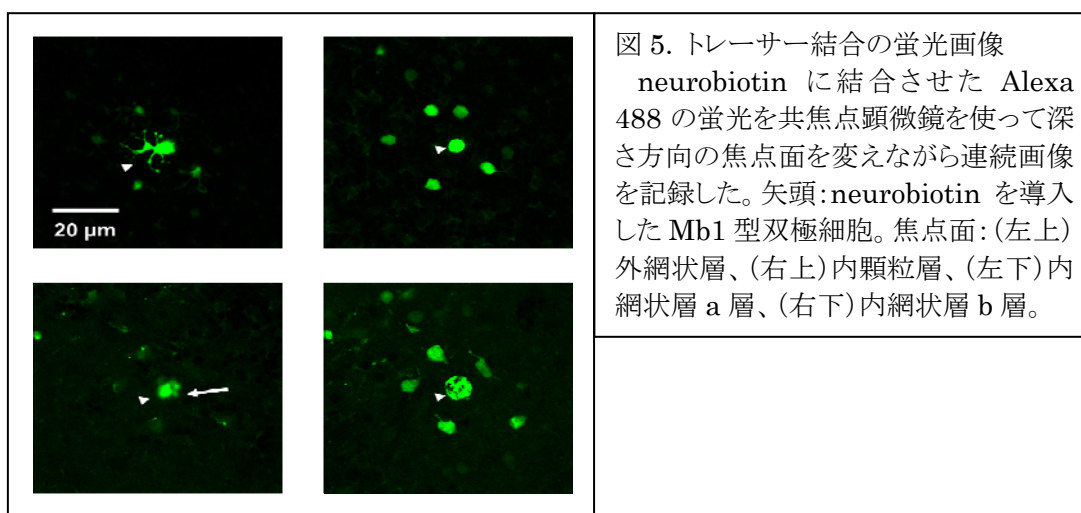


図 5. トレーサー結合の蛍光画像
neurobiotin に結合させた Alexa 488 の蛍光を共焦点顕微鏡を使って深さ方向の焦点面を変えながら連続画像を記録した。矢頭:neurobiotin を導入した Mb1 型双極細胞。焦点面:(左上)外網状層、(右上)内顆粒層、(左下)内網状層 a 層、(右下)内網状層 b 層。

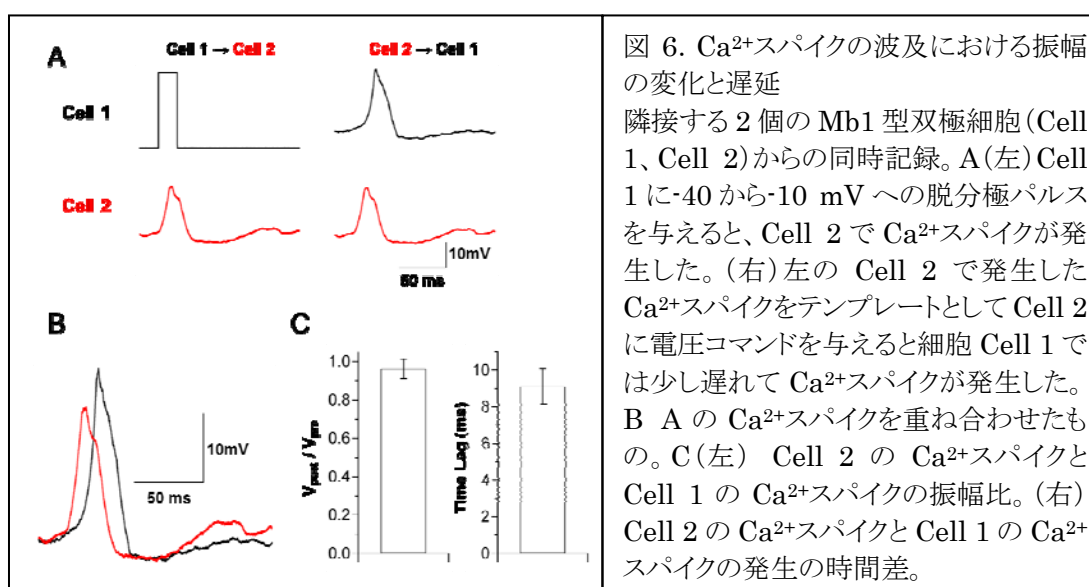


図 6. Ca^{2+} スパイクの波及における振幅の変化と遅延
隣接する 2 個の Mb1 型双極細胞 (Cell 1、Cell 2) からの同時記録。A (左) Cell 1 に -40 から -10 mV への脱分極パルスを与えると、Cell 2 で Ca^{2+} スパイクが発生した。(右) 左の Cell 2 で発生した Ca^{2+} スパイクをテンプレートとして Cell 2 に電圧コマンドを与えると細胞 Cell 1 では少し遅れて Ca^{2+} スパイクが発生した。B A の Ca^{2+} スパイクを重ね合わせたもの。C (左) Cell 2 の Ca^{2+} スパイクと Cell 1 の Ca^{2+} スパイクの振幅比。(右) Cell 2 の Ca^{2+} スパイクと Cell 1 の Ca^{2+} スパイクの発生時間差。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- 1). Katoh, K., Omori, Y., Onishi, A., Sato, S., Kondo, M. & Furukawa, T., Blimp1 suppresses Chx10 expression in differentiating retinal photoreceptor precursors to ensure proper photoreceptor development. *J. of Neurosci.* 30(19), 6515-6526 (2010). doi: 10.1523/JNEUROSCI.0771-10.2010
- 2). Kanagawa, M., Omori, Y., Sato, S., Kobayashi, K., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Endo, T., Furukawa, T. & Toda T. Post-translational maturation of dystroglycan is necessary for pikachurin binding and ribbon synaptic localization. *J. Biol. Chem.*, 285(41), 31208-31216 (2010). doi: 10.1074/jbc.M110.116343
- 3). Krizaj, D., Huang, W., Furukawa, T., Punzo, C. & Xing, W., Plasticity of TRPM1 expression and localization in the wild type and degenerating mouse retina, *Vision Research*, 50, 2460-2465 (2010). doi:10.1016/j.visres.2010.08.034
- 4). Omori, Y., Chaya, T., Katoh, K., Kajimura, N., Sato, S., Muraoka, K., Ueno, S., Koyasu, T., Kondo, M. & Furukawa, T., Negative regulation of ciliary length by ciliary male germ cell-associated kinase(Mak) is required for retinal photoreceptor survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(52), 22671-22676 (2010) . doi: 10.1073/pnas.1009437108
- 5). *Kondo, M., Sanuki, R., Ueno, S., Nishizawa, Y., Hashimoto, N., Ohguro, H., Yamamoto, S., Machida, S., Terasaki, H., Adamus, Grazyna., Furukawa, T., Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction, *PLoS ONE*, in press (2011)
- 6). Omori, Y., Katoh, K., Sato, S., Muranishi, Y., Chaya, T., Onishi, A., Minami, T., Fujikado, T., & Furukawa, T., Analysis of transcriptional regulatory pathways of photoreceptor genes by expression profiling of the Otx2-deficient retina, *PLoS ONE*, in press (2011)
- 7). Arai, I., Tanaka, M., & Tachibana, M., Active roles of electrically coupled bipolar cell network in the adult retina. *Journal of Neuroscience*, 30: 9260-9270 (2010) doi: 10.1523/JNEUROSCI.1590-10.2010