

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. 研究実施体制

(1) 古川グループ

- ① 研究代表者: 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 (大西暁士、佐貫理佳子、大森義裕、荒木章之、入江彰一、渡邊哲史、古川貴久)
 - 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 (大西暁士、入江彰一、古川貴久)
 - 3). 網膜神経回路の解析 (古川貴久、大西暁士、荒木章之、立花政夫、茶屋太郎)

(2) 立花グループ

- ① 主たる共同研究者: (東京大学大学院人文社会系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - 1). 網膜神経回路の電気生理学的解析
 - (1) 動きを検出する神経回路網の解析 (立花政夫、雁木美衣、星秀夫)
 - (2) 動きを予測する神経回路網の解析 (立花政夫、星秀夫)
 - (3) 一過性・持続性応答の発現機構の解析 (立花政夫、田中雅史)

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

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、本年度は以下の研究を実施した。

(1)Dystroglycan(DG)-Pikachurin による視細胞-双極細胞間シナプス形成機構

私達が同定した細胞外マトリックス蛋白質 Pikachurin は、視細胞シナプス間隙に局在し、シナプス陥入構造形成に関与する。Pikachurin の変異マウスでは双極細胞への伝達遅延を示すことは、シナプスの「かたち」が正常な情報伝達に必須であることを示している。Pikachurin は DG と直接結合し、DG は視細胞のシナプス前部に局在する。私達は DG が糖鎖修飾を介して Pikachurin と相互作用することおよび Pikachurin がオリゴマーを形成することを確認した(*J. Biol. Chem.*, 285, 31208-31216, 2010)。

私達は視細胞のシナプス前部における陥入構造形成機構を詳細に解析するために、DG の視細胞特異的コンディショナル KO(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したPikachurin が拡散しており(図 1A)、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が観察された(図 1B)。電子顕微鏡により視細胞-双極細胞間シナプスを詳細に観察すると、双極細胞の神経突起が視細胞のシナプス前部へ入り込めなくなっていた(図 1C)。興味深いことにPikachurin KO マウスでは視細胞シナプス間隙における DG のシグナルが著しく減少していた(図 1D)。HEK293 細胞において Pikachurin を強制発現させると、細胞表面においてPikachurin-DG 複合体が形成された(図 1E)。これらの結果は、視細胞シナプス前部における DG-Pikachurin 複合体が視細胞-双極細胞間シナプス形成、視細胞から双極細胞への情報伝達に必須であり、シナプス末端における微細な形態形成がシナプス結合において重要であることを示した。私達はこの微細な形態形成のことを”micromorphogenesis”と命名し、これが DG とPikachurin により制御されることを実証した(図 2)(Omori *et al.*, *J. Neurosci.*, in press, 2012)。

DG は Dystrophin と複合体を形成し視細胞のシナプス前部に局在する。Dystrophin は筋ジストロフィーの原因遺伝子であり、筋ジストロフィーの患者では視覚情報伝達の異常を示すことが知られている。今回の研究成果は、神経細胞間のシナプス形成における分子メカニズムを明らかにしたことに留まらず、筋ジストロフィーの視覚情報伝達異常の病態解明、診断、治療にも結びつく成果であると考えられる。

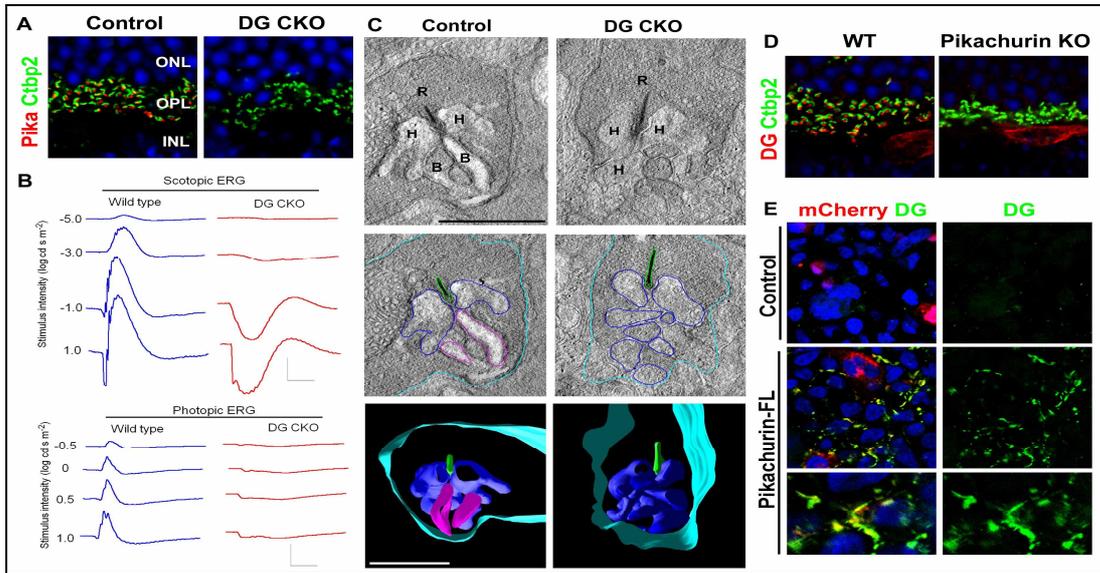


図 1. DG、Pikachurin のシナプス形成における機能解析 (A)組織学的解析。DG CKO マウスでは Pikachurin(赤)のシグナルが薄くなっている。(B)電気生理学的解析。DG CKO マウスでは b 波の振幅の低下、潜時の延長がみられる。(C)電子顕微鏡を用いた解析。DG CKO マウスでは双極細胞の神経突起がシナプス前部に入り込んでいない。(D)組織学的解析。Pikachurin KO マウスでは DG(赤)のシグナルが薄くなっている。(E)Pikachurin 発現による DG のクラスタリング。HEK293 細胞において Pikachurin を過剰発現させると細胞表面に DG のクラスタリングが誘導される。

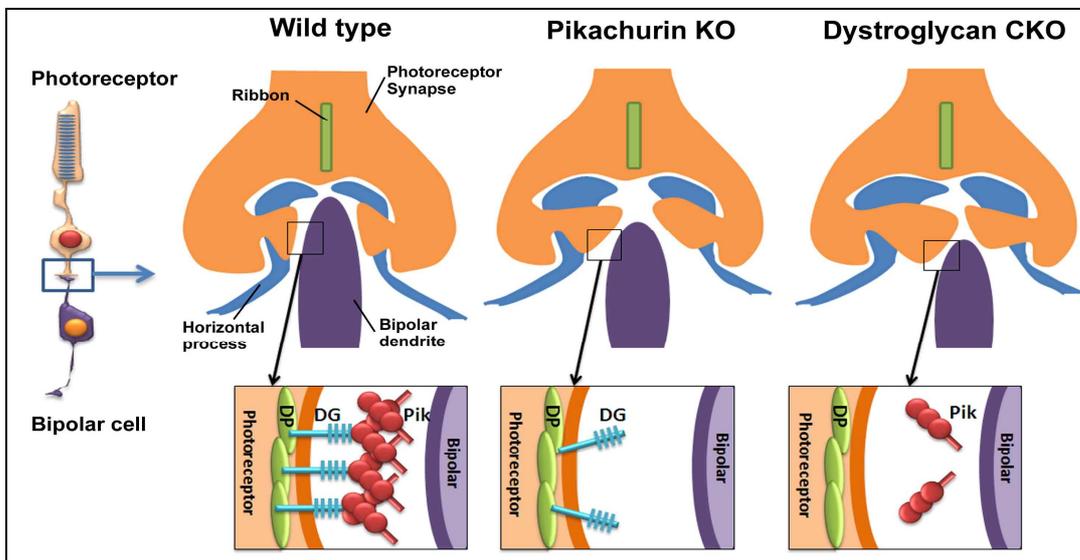


図 2. DG、Pikachurin の視細胞-双極細胞間シナプス形成における役割についてのモデル図。野生型マウスでは、Pikachurin がオリゴマーを形成し、DG のクラスタリングを誘導する。Pikachurin KO マウスでは Pikachurin による DG のクラスタリングが誘導されず、シナプスの構造異常を示す。DG CKO マウスでは Pikachurin は存在するが、DG のクラスタリングが誘導されずシナプスの構造異常を示す。

(2)動きを検出する神経回路網の解析

哺乳類網膜では、運動方向選択性を示す2種類の神経節細胞が知られている。ON-OFF型運動方向選択性神経節細胞における方向選択性は starburst アマクリン細胞の関与が明らかにされているが、ON型運動方向選択性神経節細胞における方向選択性に関しては、シナプス前細胞であるアマクリン細胞のサブタイプが未だ同定されていない。ラット網膜 ON型運動方向選択性神経節細胞の投射核である副視索系内側終止核に越シナプス性トレーサーである狂犬病ウィルスを注入した結果、starburst アマクリン細胞のみならず別のサブタイプのアマクリン細胞も関与している可能性が示唆された。また、ウサギ網膜では ON型運動方向選択性神経節細胞に2種類のサブタイプが存在することが明らかになった(Hoshi *et al.*, J Comp Neurol.,519,2509,2011)。そこで、ラットの副視索系内側終止核に逆行性の蛍光色素を注入し、蛍光標識された網膜神経節細胞から記録した結果、効率的にON型運動方向選択性神経節細胞の応答を記録することができるようになった。また柳川右千夫教授の作成した VGAT-Venus ラットを用いることによって、蛍光標識されたGABA作動性アマクリン細胞から光応答を記録し、neurobiotinを細胞内注入することによって細胞形態を解析し、GABA作動性アマクリン細胞のサブタイプを分類した。

(3)動きを予測する神経回路網の解析

オブジェクトの動きの予測は既に網膜で行われているという先行報告がある(Berry *et al.*, 1999)。しかし、どのような網膜神経回路網でこのような予測が可能になるのかは不明である。そこで、剥離網膜標本にパッチクランプ法を適用して、単一の神経節細胞から光応答を記録した。動くバー刺激と静止したフラッシュ・バー刺激を記録している細胞の細胞体を中心とした広い領域に呈示し、興奮性シナプス後電位およびスパイク発火を記録し解析した。その結果、動くバー刺激の方が静止したフラッシュ・バー刺激よりも早くスパイク発火する神経節細胞が見つかった。神経節細胞の樹状突起の空間分布とスパイク発火との関連を詳細に検討中である。

(4)一過性・持続性応答の発現機構の解析

キンギョ網膜の ON型双極細胞の一つである Mb1型双極細胞の出力を受け取るシナプス後細胞の自発性 EPSC を解析した結果、一過性 EPSC が主体の細胞、持続性 EPSC が主体の細胞、両者が混在する細胞が存在し、さらに、これらの細胞が、樹状突起を伸ばす亜層を別とする異なるサブタイプであることが明らかになった。Ca²⁺バッファーであるEGTAは、Mb1型双極細胞からの出力のうち、リボン無しシナプスからの出力のみを選択的に抑制できることが知られている。そこで、Mb1型双極細胞に脱分極パルスを与え、シナプス後細胞で生じる EPSC が、EGTAによって抑制される程度を調べることで、リボン無しシナプスからの出力の寄与率を調べた。その際、樹状突起間のギャップ結合を介して電氣的に繋がった Mb1型双極細胞群全てに EGTA を導入するため、細胞膜透過性の EGTA-AM を灌流投与する手法を用いた。その結果、一過性 EPSC が主体のシナプス後細胞では EGTA の影響がほとんど見られなかったが、持続性 EPSC が主体のシナプス後細胞では EGTA によって EPSC が大きく抑制され、持続性 EPSC と一過性 EPSC が混在するシナ

プス後細胞でも、より穏やかではあったが、EGTA による EPSC の抑制が観察された。したがって、本実験の結果、シナプス後細胞ごとに EGTA による EPSC の減少率が異なっていたことは、リボン無しシナプスが、Mb1 型双極細胞の出力経路として用いられている機能的シナプスであることを示すものである。さらに、EGTA による減少率が EPSC の持続時間と相関していたことは、シナプス後細胞での持続性応答の形成にリボン無しシナプスが関与していることを示唆している。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Omori Y, Araki F, Chaya T, Kajimura N, Irie S, Terada K, Muranishi Y, Tsujii T, Ueno S, Koyasu T, Tamaki Y, Kondo M, Amano Sh, Furukawa T. Presynaptic dystroglycan-pikachurin complex regulates the proper synaptic connection between retinal photoreceptor and bipolar cells. *J. Neurosci.* in press.
2. Xu Y, Dhingra A, Fina M, Koike C, Furukawa T, Vardi N. mGluR6 Deletion Renders the TRPM1 Channel in Retina Inactive. *J. Neurophysiol.* 107:948-957, 2012. (doi: 10.1152/jn.00933.2011)
3. Sanuki R, Onishi A, Koike C, Muramatsu R, Watanabe S, Muranishi Y, Irie S, Ueno S, Koyasu T, Matsui R, Cherasse Y, Urade Y, Watanabe D, Kondo M, Yamashita T, Furukawa T. Rncr3, which encodes miR-124a, is required for hippocampal axon development and retinal cone photoreceptor survival through Lhx2 suppression. *Nat. Neurosci.* 14:1125-1134, 2011. (DOI:10.1038 /nn.2897)
4. Ogata-Iwao M, Inatani M, Iwao K, Takihara Y, Nakaishi-Fukuchi Y, Irie F, Sato S, Furukawa T, Yamaguchi Y, Tanihara H. Heparan sulfate regulates intraretinal axon pathfinding by retinal ganglion cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52:6671-9, 2011. (DOI:10.1167 /iovs.11-7559)
5. Pearring J, Bojang Jr P, Shen Y, Koike C, Furukawa T, Nawy S, Gregg R. A role for nyctalopin, a small leucine-rich repeat protein, in Localizing the TRP melastatin 1 channel to retinal depolarizing bipolar cell dendrites. *J. Neurosci.* 31:10060-10066, 2011. (doi: 10.1523/?JNEUROSCI.1014-11.2011)
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.* 6:e19685, 2011. (doi:10.1371/journal.pone.0019685)
7. Kondo M, Sanuki R, Ueno S, Nishizawa Y, Hashimoto N, Ohguro H, Yamamoto S, Machida S, Terasaki H, Adamus G, Furukawa T. Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction. *PLoS ONE* 6:e19911, 2011. (doi:10.1371/journal.pone.0019911)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)