

## 132. 網膜における活動依存的な神経回路網形成機構の解明

佐貫 理佳子

Key words : 網膜, 神経回路

大阪大学 蛋白質研究所

### 緒言

神経網膜は神経細胞の細胞体が存在する顆粒層（外顆粒層，内顆粒層，神経節細胞層）とシナプスが存在し神経回路網が発達する場所（外網状層，内網状層）が限定されているため，シナプス結合の詳細な観察が可能であり神経回路形成の良いモデルである．網膜では二次ニューロンである双極細胞以降，光刺激によって神経細胞の興奮が起こる ON 経路と光刺激の消失によって興奮が起こる OFF 経路があり，それらの回路は内網状層での軸索投射位置や樹状突起の配置によって明確に分類することができる．マウスにおける双極細胞の ON/OFF 経路は生後 6 日目から 12 日目にかけて急速に発達する．それぞれの双極細胞は適切な視細胞とシナプス結合して外網状層で視覚系最初のシナプスを作り，軸索を内網状層に投射する．内網状層はさらに外層 (S1-S2) と内層 (S3-S5) の下位層に分けることができ，外層には OFF 型双極細胞が，内層には ON 型双極細胞が投射する．本研究ではこれら網膜神経回路ができる仕組みとその分子メカニズム，およびその視機能における機能的意義について検討した．

### 方法および結果

#### 1. 正常な ON 経路と OFF 経路の発生機構

ON/OFF 型双極細胞の形態形成や発生を調べるために，ON 型双極細胞の陽イオンチャンネル TRPM1 欠損マウスや代謝型グルタミン酸受容体の mGluR6 欠損マウス，さらに杆体視細胞に高発現する膜の足場タンパク質 Protein4.1G 欠損マウスの網膜を用いて免疫染色を行った．染色は神経回路が構築されて間もない生後 15 日目に行った．その結果，生後 15 日目の 4.1G 欠損マウスでは視細胞シナプス末端の形成の遅延に起因する双極細胞の成熟の遅れが観察された (図 1)．

マウスの網膜では杆体 ON 型双極細胞に加えて 5 種類の ON 型双極細胞と 7 種類の OFF 型双極細胞が存在している．ON，OFF それぞれの 4.1G 欠損マウスの杆体 (ON 型) 双極細胞の樹状突起先端を抗 PKCa 抗体で，OFF 型双極細胞の樹状突起先端を抗カルセリニン抗体で染色して調べたところ，ON 型，OFF 型の双極細胞は共に外網状層ではなく，外顆粒層に樹状突起を異常侵入させることが明らかとなった (図 2)．

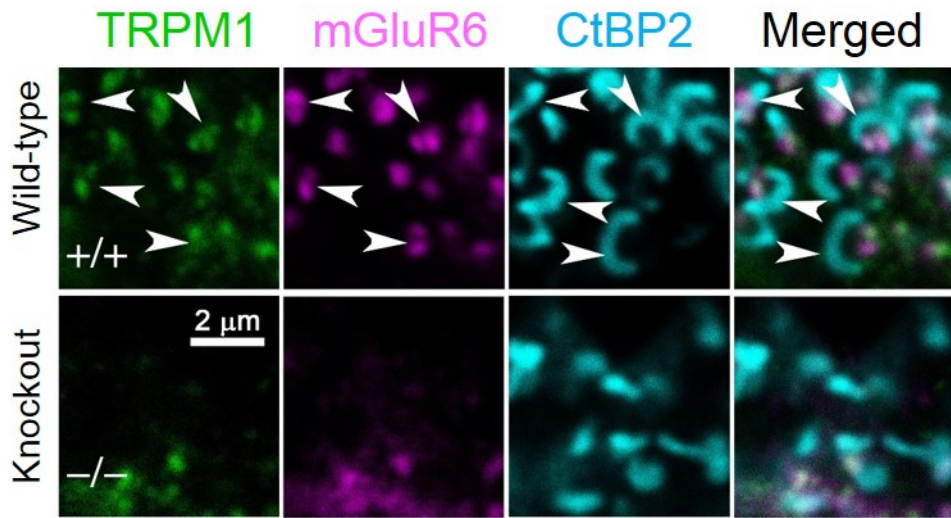


図1. 4.1G 欠損マウス網膜では双極細胞の成熟が遅れる。

生後15日目のマウス網膜を TRPM1 (緑), mGluR6 (マゼンタ) および CtBP2 (シアン) に対する抗体で染色した。野生型では典型的な馬蹄形の視細胞シナプスリボンと双極細胞の樹状突起先端への TRPM1 と mGluR6 の集積が観察された(矢頭)。4.1G 欠損マウスでは視細胞のリボンシナプス形成に必要な CtBP2 の集積の遅れがあり、また双極細胞側では TRPM1 や mGluR6 の樹状突起先端への蓄積が認められなかった。

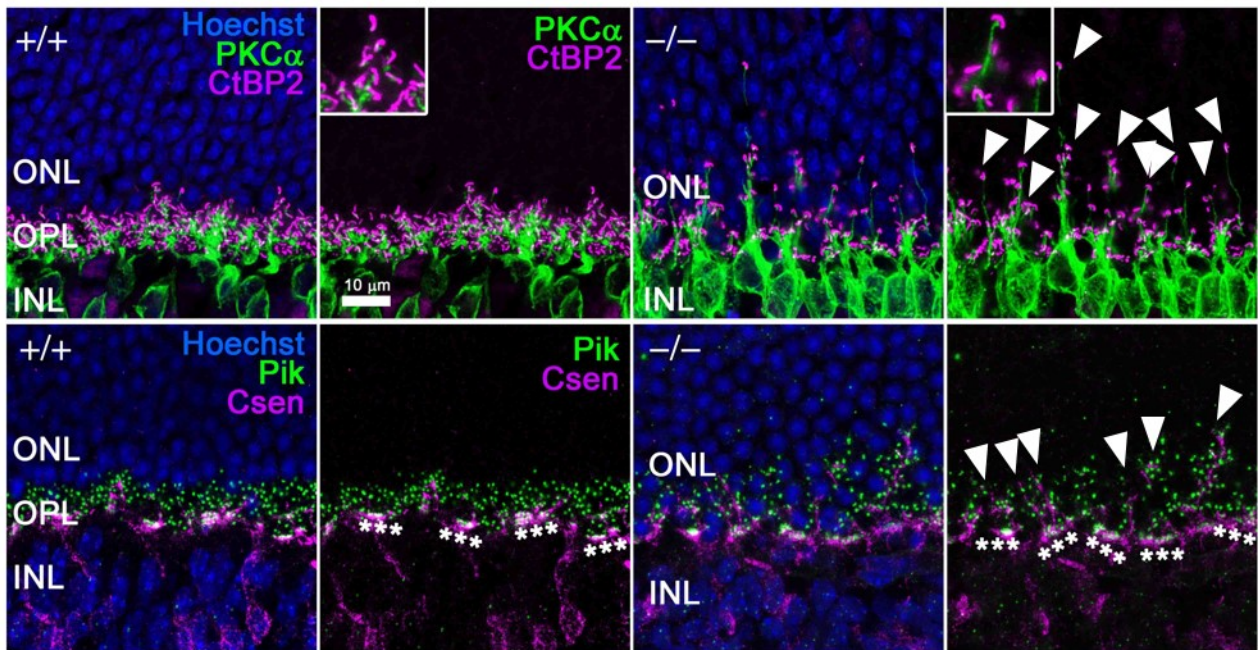


図2. 4.1G 欠損マウスにおける ON/OFF 双極細胞のシナプス形成位置の異常。

野生型と4.1G 欠損マウス網膜の組織を ON 杆体双極細胞マーカーの PKCα (緑) と視細胞シナプスマーカーの CtBP2 (マゼンタ) で染色した(上図)。野生型と4.1G 欠損マウス網膜の組織を OFF 型双極細胞マーカーのカルセリニン (Csen, マゼンタ) と視細胞シナプスマーカーのピカチュリン (Pik, 緑) で染色した(下図)。4.1G 欠損マウスでは ON 型と OFF 型の双極細胞樹状突起が共に視細胞層へと異常侵入し(矢頭)、視細胞と異所的にシナプスを形成していた。

## 2. ON/OFF 経路に作用する介在神経細胞の同定

双極細胞で分岐した ON/OFF それぞれの経路は内網状層で神経節細胞へと情報を伝達する。内網状層は S1-S5 からなる下位層から成り、S1 と S2 は OFF 経路の神経情報が、S3-S5 では ON 経路の神経情報が処理されている。双極細胞と介在神経細胞のアマクリン細胞がそれら情報処理の主要を担うが、各アマクリン細胞の役割はほとんど明らかにされていない。私たちはアマクリン細胞で高発現する転写因子の Prdm13 (PR domain containing 13) を同定し、その欠損マウスを作製し網膜を観察したところ、ON と OFF を分断する神経束を形成するアマクリン細胞が欠失することが明らかとなった (図 3)。

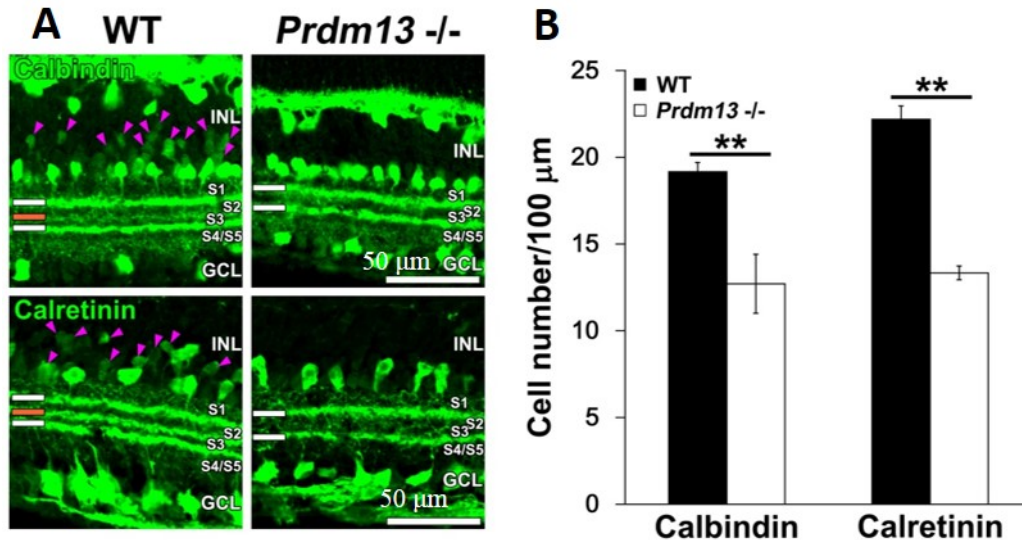


図 3. Prdm13 欠損網膜の ON/OFF 層分離束形成アマクリン細胞の欠失。

A) 内網状層の下位層を構成する神経細胞マーカーのカルビンジンもしくはカルレチニン染色像。Prdm13 欠損マウスでは ON/OFF を分ける神経束を欠き、カルビンジンやカルレチニン陽性の神経細胞の減少が観察された見られた (矢頭)。B) 野生型と Prdm13 欠損マウス網膜のカルビンジンとカルレチニン陽性アマクリン細胞の数。 \*\*p < 0.01 by student's t-test.

## 考 察

本研究では網膜を構成する神経回路の発達と神経活動との関連について解析した。4.1G 欠損マウスでは視細胞のシナプス形成が遅れる。それに伴い、4.1G 欠損マウスの双極細胞は視細胞とシナプスを形成するべく視細胞層に侵入した。このような視細胞-双極細胞間のシナプス形成位置の異常は老化したヒト網膜でも観察されている。本研究結果により、老化網膜の異所性シナプス形成は視細胞側の変化に起因することが考えられる。今後はこのような異所性シナプスがどのように視機能に影響するのかを検討したい。また今回、VGLUT1 欠損マウスでは明らかな神経回路の形成異常は観察されなかった。これはグルタミン酸の放出とシナプスの形成位置とは無関係であることを示している。一般的に網膜視細胞-側局細胞のシナプスの形成過程においてはグルタミン酸の放出がその引き金になると考えられていたが、本研究結果はそれを支持しない新しい知見である。

また、ON/OFF 層を分ける神経束を形成する網膜介在神経細胞を失ったマウスを Prdm13 欠損マウスを作製することで得ることができた。今後、同マウスを用いた解析をさらに進めることで、網膜神経回路の機能と未知のアマクリン細胞の機能が解明されると期待できる。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は大阪大学蛋白質研究所分子発生学研究室の古川貴久教授である。また本稿を終えるにあたり、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Watanabe, S., Sanuki, R., Sugita, Y., Imai, Y., Yamazaki, Y., Kozuka, T. & Furukawa, T. : Prdm13 regulates subtype specification of retinal amacrine interneurons and modulates visual sensitivity. *J. Neurosci.*, **35** : 8004-8020, 2015.
- 2) Sanuki, R., Watanabe, S., Sugita, Y., Irie, S., Kozuka, T., Shimada, M., Ueno, S., Usukura, J. & Furukawa, T. : Protein-4.1G-mediated membrane trafficking is essential for correct rod synaptic location in the retina and for normal visual function. *Cell Rep.*, **10** : 796-808, 2015.
- 3) Watanabe, S., Sanuki, R., Ueno, S., Koyasu, T., Hasegawa, T. & Furukawa, T. : Tropisms of AAV for subretinal delivery to the neonatal mouse retina and its application for *in vivo* rescue of developmental photoreceptor disorders. *PLoS One*, **8** : e54146, 2013.