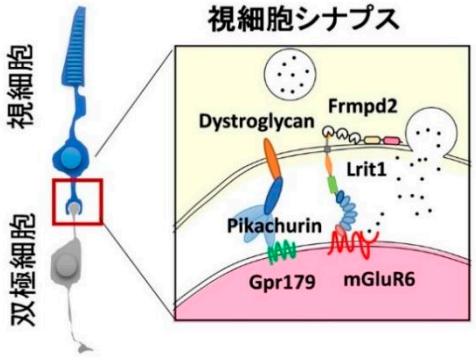
27　網膜のON・OFF回路形成と視覚情報処理機構の解析	大森　義裕

【目的】網膜の細胞種は、大きく 5 種類のニューロン（視細胞、双極細胞、神経節細胞、水平細胞、アマクリン細胞）と 1 種類のグリア細胞から成る。2 次ニューロンである双極細胞には、明るくなるとより活動する ON 型双極細胞と暗くなるとより活動する OFF 型双極細胞が存在し、3 次ニューロンである神経節細胞も ON 型と OFF 型に分かれる。視覚においては ON・OFF 経路による並列情報処理がショウジョウバエからヒトに至るまで行われることが特徴である。しかしながら、視細胞が受けた「明暗コントラスト」「輪郭」「動き」「色」といった情報が、どのように ON 経路と OFF 経路に振り分けられ、情報処理されるかはほとんど不明であり、特異的シナプスの形成と維持のメカニズムの理解は非常に重要であるが、その分子機構はいまだによく分かっていない。これまでに、筋ジストロフィーの原因分子の一つである膜蛋白質ジストログリカンと視細胞シナプスに局在する分泌蛋白質ピカチュリンが直接相互作用し、視細胞－双極細胞の特異的シナプス形成を制御することを明らかにした。また、視細胞シナプスに局在するシナプス形成因子である Lrit1 と足場蛋白質 Frmpd2 や双極細胞プレシナプスに局在するグルタミン酸レセプターmGluR6 と相互作用することにより、Lrit1-Frmpd2-mGluR6 複合体を形成し、今まで不明であった錐体視細胞の ON 経路におけるシナプス形成を制御していることを報告している。しかし、これらのシナプス形成因子がどのようなメカニズムで機能しているのかその全体像は明らかとなっていない。一方で、これらの ON・OFF 回路形成には数種類の視細胞に対して、10 数種類の双極細胞が接続することが知られているが、これらの細胞の分化過程やシナプス制御因子の細胞種特異的な遺伝子発現機構は明らかとなっていない。網膜視細胞分化においてホメオボックス転写因子である Otx2 と Crx が重要な役割を担っていることが明らかとなりつつあるが、いずれも視細胞や双極細胞、それらの前駆細胞に発現し相互にホモロジーが高く構造的に類似しているが、発現時期や細胞種による発現量の差があり、視細胞と双極細胞の分化や成熟にどのように機能しているか明らかではない。これらの ON・OFF 回路の形成におけるシナプスの形成因子とこれらの細胞の分化や発現制御を行う転写因子について *in vivo* モデルを使った研究を行った。

【方法】ピカチュリン欠損マウスの網膜における、Gpr179 の局在を解析することを試みた。1 ヵ月齢の野生型マウスとピカチュリン欠損マウスから、作製した凍結切片を用いて Gpr179／Rgs11 の蛍光免疫染色を行いコンフォーカル顕微鏡による観察を行った。また、*Otx2* と *Crx* の遺伝子を置き換えたマウス（Otx2 KI、Crx KI マウス）を作製し、その表現型を観察した。

【結果】野生型マウスでは視細胞のシナプスに、Gpr179 と Rgs11 の局在が見られたが、ピカチュリン欠損マウスではこれらの局在が消失していることが観察された。このことから、Gpr179 と Rgs11 の局在はシナプスマトリクス蛋白質であるピカチュリンの存在に依存していることが明らかとなった。一方、*Otx2* 遺伝子座を *Crx* と置き換えた Crx KI マウスの網膜では、正常な視細胞前駆細胞が生産されず異常な前駆細胞は細胞死を起こした。*Crx* 遺伝子座を *Otx2* と置き換えた Otx2 KI マウスでは正常な視細胞が形成されず異常な視細胞が形成された。Otx2 と Crx は互いに機能を代替することができず、大きく機能が異なっていることが明らかとなった。

網膜 ON・OFF 回路形成を制御するシナプス形成因子



27. 網膜の ON・OFF 回路形成と視覚情報処理機構の解析

大森　義裕

*大阪大学 蛋白質研究所 分子発生学研究室

Key words：網膜，視細胞，双極細胞，シナプス，転写制御

緒　言

外界の光情報を眼の後部で検知する網膜は、後に間脳になる脳領域が胎生期に膨出して形成される中枢神経系の組織である。網膜は、双極細胞や水平細胞の働きによって明暗コントラストの検出を行い、アマクリン細胞では物体の運動方向を検出するなど、「明暗コントラスト」「動き」「色識別」といった重要な視覚情報の抽出と処理を行う。脳に比べて網膜は構造が比較的単純であり、光からの情報の流れが一方向で、生体レベルでの実験や観察が容易であることなどから、欧米で網膜は中枢神経系研究の良いモデルとして「Windows to the brain」と言われてきた。網膜は、大きく 5 種類のニューロン（視細胞、双極細胞、神経節細胞、水平細胞、アマクリン細胞）と 1 種類のグリア細胞から成る。光情報の感受と電気信号への変換は網膜最外層に存在する視細胞が行う。特徴抽出は双極細胞以降の下流ニューロンの網膜内神経回路で行われる。視細胞には、明暗を感知する杆体視細胞と色覚を感知する錐体視細胞が存在する。2 次ニューロンである双極細胞には、明るくなるとより活動する ON 型双極細胞と暗くなるとより活動する OFF 型双極細胞が存在し、3 次ニューロンである神経節細胞も ON 型と OFF 型に分かれる。視覚においては ON・OFF 経路による並列情報処理がショウジョウバエからヒトに至るまで行われることが特徴である。しかしながら、視細胞が受けた「明暗コントラスト」「輪郭」「動き」「色」といった情報が、どのように ON 経路と OFF 経路に振り分けられ、情報処理されるかはほとんど不明である。以上のように、網膜視覚生理機能と特定のシナプス経路が密接に関連していることから、特異的シナプスの形成と維持のメカニズムの理解は非常に重要であるが、その分子機構はいまだによく分かっていない。

私たちは、これまでに筋ジストロフィーの原因分子の一つである膜蛋白質ジストログリカンと視細胞シナプスに局在するマトリクス蛋白質ピカチュリンが直接相互作用し、視細胞－双極細胞の特異的シナプス形成を制御することを明らかにした［1，2］。膜糖鎖蛋白質ジストログリカンやピカチュリンの欠損マウスでは、網膜電図の異常が見られ、電子顕微鏡による観察では、視細胞-双極細胞シナプス接続部における微細構造の異常が明らかとなった［1，2］。また、生化学的な実験によりジストログリカンとピカチュリンの相互作用には糖鎖修飾が必須であり、ピカチュリンのラミニン G ドメインが重要であることを見出した。最近、視細胞シナプスに局在するシナプス形成因子である Lrit1 が足場蛋白質 Frmpd2 や双極細胞プレシナプスに局在するグルタミン酸レセプターmGluR6 と相互作用することにより、Lrit1-Frmpd2-mGluR6 複合体を形成し、今まで不明であった錐体視細胞の ON 経路におけるシナプス形成を制御していることを報告している［3］。しかし、これらのシナプス形成因子がどのようなメカニズムで機能しているのかその全体像は明らかとなっていない。一方で、これらの ON・OFF 回路形成には数種類の視細胞に対して、10 数種類　の双極細胞が接続することが知られているが、これらの分化過程やシナプス制御因子の細胞種特異的な発現機構は明らかとなっていない。網膜視細胞分化においてホメオボックス転写因子である Otx2 と Crx が重要な役割を担っていることが明らかとなりつつあるが、いずれも視細胞や双極細胞、それらの前駆細胞に発現し相互にホモロジーが高く構造的に類似しているが、発現時期や細胞種による発現量の差があり、視細胞と双極細胞の分化や成熟にどのように機能しているか明らかではない。本研究課題では、これらの ON・OFF 回路の形成におけるシナプスの形成因子とこれらの細胞の分化や発現制御を行う転写因子について *in vivo* モデルを使った研究を行った。

*現在の所属：長浜バイオ大学 大学院バイオサイエンス研究科

方法および結果

1. 視細胞シナプス形成因子と相互作用する因子の探索と *in vivo* におけるシナプス局在

これまでに生体組織を用いたプロテオミクス解析により、ピカチュリンがオーファン G 蛋白質結合型レセプターである Gpr179 と相互作用する可能性が示唆される結果が得られた。そこで、私たちはピカチュリン欠損マウスの網膜における、Gpr179 の局在を解析することを試みた。1 ヵ月齢の野生型マウスとピカチュリン欠損マウスから、眼球を単離した。眼科用微小ハサミとピンセットを用いて前眼部を切り取り eye cup を作製した。4%PFA／PBS 中で室温において 30 分間インキュベートし、組織を固定した。PBS による洗浄後、30%シュークロースに 4℃で一昼夜保温した。eye cup を OTC コンパウンド中に埋め込み−80℃で凍結することでブロックを作製した。凍結ブロックからクライオスタットを用いて 20 μm の厚みのセクションを作製し、スライドグラスに張り付け乾燥させた。このスライドにブロッキングを行い、1 次抗体を常温で 4 時間作用させた。2 次抗体は 4℃で一昼夜反応させた。スライドを PBS で洗浄後、マウント剤を滴下しカバーグラスを装着し標本とした。このスライドに対しコンフォーカル顕微鏡を用いて観察を行った。野生型マウスでは、DAPI（青）で染色された視細胞の核の層（視細胞層）の下部に存在する外網状層に存在する視細胞のシナプスに、Gpr179（緑）と G 蛋白質シグナル伝達調節因子 Rgs11（Regulator of G-protein signaling 11）（赤）の局在が見られた（図 1 左列）。一方、ピカチュリン欠損マウスではこれらの局在が消失していることが観察された（図 1 右列）。このことから、Gpr179 と Rgs11 の局在はシナプスマトリクス蛋白質であるピカチュリンの存在に依存していることが明らかとなった［4，5］。

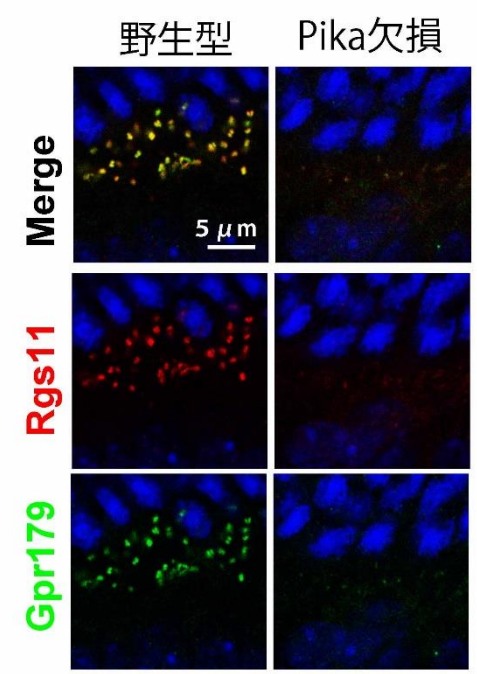


図 1. ピカチュリン欠損マウスの網膜における Gpr179 と Rgs11 の視細胞シナプスへの局在の消失
蛍光免疫染色法によりマウス網膜の凍結切片を抗 Gpr179 抗体（緑）と抗 Rgs11 抗体（赤）を用いて染色した。野生型マウスでは、DAPI（青）で染色された視細胞の核の層（視細胞層）の下部に存在する外網状層に存在する視細胞のシナプスに、Gpr179 と Rgs11 が局在するが、ピカチュリン欠損マウスではこれらの局在が消失している。Gpr179 と Rgs11 の局在はシナプスマトリクス蛋白質であるピカチュリンの存在に依存していることが明らかとなった。

2. 視細胞と双極細胞におけるシナプス形成因子の発現制御

私たちは *Otx2* と *Crx* の遺伝子を置き換えたマウス（Otx2 KI、Crx KI マウス）を作製し、その表現型を観察した。*Otx2* 遺伝子座を *Crx* と置き換えた Crx KI マウスの網膜では、正常な視細胞前駆細胞が生産されず異常な前駆細胞は細胞死を起こした。逆に *Crx* 遺伝子座を *Otx2* と置き換えた Otx2 KI マウスでは正常な視細胞が形成されず異常な視細胞が形成された。Otx2 と Crx は互いに機能を代替することができず、大きく機能が異なっていることが明らかとなった。さらにレトロウイルスを用いた強制発現実験とノックダウン実験により Otx2 は細胞運命決定後の双極細胞の成熟および維持に重要な役割を持つことが明らかとなった（図 2）[6]。

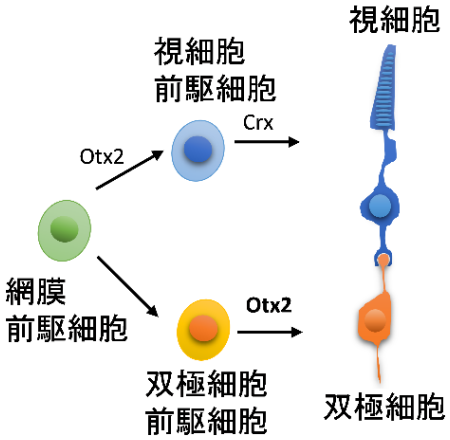


図 2. Crx KI、Otx2 KI マウスを用いた網膜における視細胞、双極細胞の分化における役割の解明

ゲノム上の *Crx* と *Otx2* の遺伝子をそれぞれおき替えたマウスを作製し網膜における表現型を解析した。この実験により、Crx と Otx2 の機能は互いに代替できないことが明らかとなった。さらにレトロウイルスを用いた強制発現実験とノックダウン実験を行うことで Otx2 は細胞運命決定後の双極細胞の成熟および維持に重要な役割を持つことが明らかとなった。

考　察

1. ピカチュリン欠損マウスにおけるシナプス蛋白質の局在

ピカチュリンージストログリカンーGpr179 複合体を形成することで ON 経路のシナプスの形成を制御していることがわかった。ヒトにおいては mGluR6 や Gpr179 の異常が変性を伴わない夜盲を引き起こすことが知られており、これらの疾患における変異とピカチュリンの多型に関連があるのか興味がもたれる。また、これらの分子の変異に基づくヒト視覚生理機能と病態メカニズムとの関連も興味深い。

2. 視細胞と双極細胞におけるシナプス形成因子の発現制御

Otx2 と Crx は互いに類似した DNA 配列に結合することが知られているが、これらの機能の違いはどのようなメカニズムで実現されているのかという点について、分子のドメインレベルの更に深い研究が必要である。これらの研究から得られた結果により、Otx2 と Crx が制御する視細胞・双極細胞の発生システムの全体像を理解することに繋がると考えられる。また、神経系において高発現する microRNA である miR-124 は脳や網膜を含む神経系に強い発現をしており網膜においても重要な役割を行うことが示唆されている。網膜の ON・OFF 回路形成において miR-124 がどのようなターゲットを制御することで多様な網膜の神経細胞の発生を制御しているのかについても興味がもたれる［7，8］。

文 献

1) Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K, Funabiki K, Koyasu T, Kajimura N, Miyoshi T, Sawai H, Kobayashi K, Tani A, Toda T, Usukura J, Tano Y, Fujikado T, Furukawa T. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. Nat Neurosci. 2008 Aug;11(8):923-31. Epub 2008 Jul 20. PMID: 18641643 doi: 10.1038/nn.2160.

2) 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 S, Furukawa T. Presynaptic dystroglycan-pikachurin complex regulates the proper synaptic connection between retinal photoreceptor and bipolar cells. J Neurosci. 2012 May 2;32(18):6126-37. PMID: 2255301 doi: 10.1523/JNEUROSCI.0322-12.2012.

3) Ueno A, Omori Y, Sugita Y, Watanabe S, Chaya T, Kozuka T, Kon T, Yoshida S, Matsushita K, Kuwahara R, Kajimura N, Okada Y, Furukawa T. Lrit1, a Retinal Transmembrane Protein, Regulates Selective Synapse Formation in Cone Photoreceptor Cells and Visual Acuity. Cell Rep. 2018 Mar 27;22(13):3548-3561. PMID: 29590622 doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.007.

4) Orlandi C, Omori Y, Wang Y, Cao Y, Ueno A, Roux MJ, Condomitti G, de Wit J, Kanagawa M, Furukawa T, Martemyanov KA. Transsynaptic Binding of Orphan Receptor GPR179 to Dystroglycan-Pikachurin Complex Is Essential for the Synaptic Organization of Photoreceptors. Cell Rep. 2018 Oct 2;25(1):130-145.e5. PMID: 30282023 doi: 10.1016/j.celrep.2018.08.068.

5) Furukawa T, Ueno A, Omori Y. Molecular mechanisms underlying selective synapse formation of vertebrate retinal photoreceptor cells. Cell Mol Life Sci. 2020 Apr;77(7):1251-1266. Epub 2019 Oct 4. PMID: 31586239 doi: 10.1007/s00018-019-03324-w.

6) Yamamoto H, Kon T, Omori Y, Furukawa T. Functional and Evolutionary Diversification of Otx2 and Crx in Vertebrate Retinal Photoreceptor and Bipolar Cell Development. Cell Rep. 2020 Jan 21;30(3):658-671.e5. PMID: 31598877 doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.072.

7) Sanuki R1, Onishi A, Koike C, Muramatsu R, Watanabe S, Muranishi Y, Irie S, Uneo S, Koyasu T, Matsui R, Chérasse Y, Urade Y, Watanabe D, Kondo M, Yamashita T, Furukawa T. miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. Nat Neurosci. 2011 Aug 21;14(9):1125-34. PMID: 21857657 doi: 10.1038/nn.2897.

8) Kozuka T, Omori Y, Watanabe S, Tarusawa E, Yamamoto H, Chaya T, Furuhashi M, Morita M, Sato T, Hirose S, Ohkawa Y, Yoshimura Y, Hikida T, Furukawa T. miR-124 dosage regulates prefrontal cortex function by dopaminergic modulation. Sci Rep. 2019 Mar 5;9(1):3445. PMID: 30837489 doi: 10.1038/s41598-019-38910-2.